

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK**

Vedran Božičević

**FILOSTRATIGRAFSKA ANALIZA
EVOLUCIJSKOG NASTANKA
ORGANSKIH SUSTAVA KOD
VIŠESTANIČNIH ŽIVOTINJA**

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2009. godina

Ovaj rad, izrađen na Zavodu za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod stručnim vodstvom dr. sc. Tomislava Domazeta-Loše i doc. dr. sc. Krunoslava Brčića-Kostića, naslovnog docenta PMF-a, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja dipl. inž. biologije, smjer ekologija.

Zahvalio bih se dr. sc. Tomislavu Domazetu-Loši, koji je osmislio ovaj rad i vodio me kroz sve probleme vezane za njegovu izradu, te svojim savjetima i iskustvom pridonio mojem sagledavanju problema kroz oči znanstvenika.

Također se zahvaljujem na potpori doc. dr. sc. Krunoslavu Brčiću-Kostiću, koji je bio moj službeni voditelj. Kolegama iz laboratorija hvala na konstantnoj spremnosti na raspravu oko bilo kakvih pitanja, promišljenih ili onih malo manje promišljenih, koja su pratila nastanak ovoga rada. Njihove su konstruktivne kritike znatno doprinijele njegovom konačnom izgledu i prezentaciji.

Hvala od srca mojoj obitelji na potpori tijekom studija, koji se pokazao dugotrajnijim i iscrpljivijim nego što je to jedan osamnaestogodišnjak na prvoj godini uopće mogao zamisliti. Oni su me podržavali i bodrili tijekom mojih padova i veselili se, više nego itko drugi, mojim uspjesima.

Na kraju, zahvaljujem svim prijateljima s kojima sam provodio predavanja, praktikume, seminare, ispite, kave, terene, tulumе i putovanja, a koji su vrijeme studiranja učinili nezaboravnim.

U Zagrebu, prosinac 2009.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

FILOSTRATIGRAFSKA ANALIZA EVOLUCIJSKOG NASTANKA ORGANSKIH SUSTAVA KOD VIŠESTANIČNIH ŽIVOTINJA

Vedran Božičević

Institut Ruđer Bošković

Bijenička cesta 54

Zavod za molekularnu biologiju

HR-10000 Zagreb, Hrvatska

Organski sustavi kod životinja oblikovani su adaptacijama na razini makroevolucijskih procesa. Tradicionalno, makroevolucijske procese proučavaju paleontologija, komparativna morfologija i evolucijska razvojna biologija (tzv. "evo-devo" pristup). Komparativna genomika otvara mogućnost novih razina analize makroevolucijskih trendova. Genomska filostratigrafija je inovativni pristup unutar ovog područja, kojim se otvara mogućnost otkrivanja tragova važnih adaptivnih događaja u evoluciji. Ovaj rad usredotočuje se na filostratigrafsku analizu organskih sustava kod životinja. U tu su svrhu analizirani genomski i ekspresijski podaci vinske mušice (*Drosophila melanogaster*). Rezultati ukazuju kako je neki oblik središnjeg živčanog sustava postojao kod pretka Eumetazoa. Također, podaci podupiru prisutnost primitivnog oblika srca kod pretka Bilateria. Analize trahealnog sustava daju potporu mogućem zajedničkom podrijetlu traheja kukaca i škrga rakova. Zanimljivo, filostratigrafski signal za probavni sustav prisutan je već kod pretka Metazoa. Ovaj rad pokazao je da se filostratigrafija može upotrijebiti u makroevolucijskoj analizi složenih fenotipova, kao što su organski sustavi. Međutim, za potpunije razumijevanje njihove evolucije potrebna je dostupnost većeg broja sekvenciranih genoma, kao i boljih ekspresijskih podataka.

71 stranica, 18 slika, 146 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Marulićev trg 20/2

Ključne riječi: organski sustavi, makroevolucija, genomska filostratigrafija

Voditelj: Dr. sc. Tomislav Domazet-Lošo
Dr. sc. Krunoslav Brčić-Kostić, doc.

Ocjenitelji: Dr. sc. Krunoslav Brčić-Kostić, doc.
Dr. sc. Damjan Franjević, doc.
Dr. sc. Zlatko Liber, doc.

Rad prihvaćen: 02.12.2009.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Diploma Thesis

PHYLOSTRATIGRAPHIC ANALYSIS OF EVOLUTIONARY EMERGENCE OF ORGAN SYSTEMS IN MULTICELLULAR ANIMALS

Vedran Božičević

„Ruđer Bošković“ Institute

Division of Molecular Biology

Bijenička cesta 54

HR-10000 Zagreb, Croatia

Organ systems in animals were shaped by adaptive processes on a macroevolutionary scale. Traditionally, macroevolution is in the scope of palaeontology, comparative morphology and evolutionary developmental biology (the so-called „evo-devo“ approach). Comparative genomics provides new levels of the analysis of macroevolutionary trends. Genomic phylostratigraphy is an innovative approach in this area of research, that could be used to trace important adaptive events in evolution. In the focus of this study is the phylostratigraphic analysis of organ systems in animals. For this purpose genomic and expression data from fruit fly (*Drosophila melanogaster*) was analyzed. Data suggest that some sort of central nervous system might be present in the eumetazoan ancestor. Also, support was found for the existence of a primitive form of heart in the bilaterian ancestor. Tracheal system analyses point to a possible common origin of tracheae and gills in the common ancestor of crustaceans and insects. Interestingly, a phylostratigraphic signal for the intestinal system is already present in the common ancestor of Metazoa. This work shows that phylostratigraphy could be effectively used in macroevolutionary analyses of complex phenotypes, such as organ systems. However, for a more complete understanding of their evolution, availability of a greater number of sequenced genomes, as well as more complete expression data, would be needed.

71 pages, 18 figures, 146 references, original in: Croatian

Thesis deposited in Central biological library, Marulićev trg 20/2

Keywords: organ systems, macroevolution, genomic phylostratigraphy

Supervisors: Dr. Tomislav Domazet-Lošo

Dr. Krunoslav Brčić-Kostić, Asst. Prof.

Reviewers: Dr. Krunoslav Brčić-Kostić, Asst. Prof.

Dr. Damjan Franjević, Asst. Prof.

Dr. Zlatko Liber, Asst. Prof.

Thesis accepted: 02.12.2009.

SADRŽAJ

| | |
|--|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. MAKROEVOLUCIJA I GENOMSKA FILOSTRATIGRAFIJA | 2 |
| 1.2. DOSADAŠNJE SPOZNAJE O EVOLUCIJI ORGANSKIH SUSTAVA | 3 |
| 1.2.1. EVOLUCIJSKI NASTANAK ŽIVOTINJA | 3 |
| 1.2.2. EVOLUCIJA ORGANSKIH SUSTAVA | 5 |
| 1.2.2.1. Epidermalni sustav (epiderm) | 6 |
| 1.2.2.2. Živčani sustav | 8 |
| 1.2.2.3. Respiratorni (trahealni) sustav | 9 |
| 1.2.2.4. Cirkulatorni (optjecajni) sustav | 10 |
| 1.2.2.5. Rasplodni (reproduktivni) sustav | 11 |
| 1.2.2.6. Mišićni (muskulatorni) sustav | 11 |
| 1.2.2.7. Probavni sustav | 12 |
| 2. CILJ ISTRAŽIVANJA | 15 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 17 |
| 3.1. GENOMSKA FILOSTRATIGRAFIJA KAO METODA | 18 |
| 3.2. PRIMJENA FILOSTRATIGRAFSKE MAPE U OVOME RADU | 18 |
| 4. REZULTATI | 24 |
| 4.1. ZAMETNI LISTIĆI: EKTODERM, ENDODERM I MEZODERM | 25 |
| 4.2. EKTODERM | 27 |
| 4.3. ENDODERM | 29 |
| 4.4. MEZODERM | 31 |
| 4.5. EPIDERMALNI SUSTAV (EPIDERM) | 33 |
| 4.6. ŽIVČANI SUSTAV | 35 |
| 4.7. RESPIRATORNI (TRAHEALNI) SUSTAV | 38 |
| 4.8. CIRKULATORNI (OPTJECAJNI) SUSTAV | 41 |
| 4.9. RASPLODNI (REPRODUKTIVNI) SUSTAV | 44 |
| 4.10. MIŠIĆNI (MUSKULATORNI) SUSTAV | 46 |
| 4.11. PROBAVNI SUSTAV | 48 |
| 5. RASPRAVA | 52 |
| 5.1. EPIDERMALNI SUSTAV (EPIDERM) | 53 |
| 5.2. ŽIVČANI SUSTAV | 54 |
| 5.3. RESPIRATORNI (TRAHEALNI) SUSTAV | 54 |
| 5.4. CIRKULATORNI (OPTJECAJNI) SUSTAV | 56 |
| 5.5. RASPLODNI (REPRODUKTIVNI) SUSTAV | 57 |
| 5.6. MIŠIĆNI (MUSKULATORNI) SUSTAV | 57 |
| 5.7. PROBAVNI SUSTAV | 58 |
| 6. ZAKLJUČAK | 60 |
| 7. LITERATURA | 62 |

POPIS KRATICA

BLAST – engl. Basic Local Alignment Search Tool = osnovni alat za pretragu i lokalno sravnavanje sekvenci

CNS – engl. Central Nervous System = središnji živčani sustav

evo-devo – engl. evolutionary developmental biology

FDR – engl. False Discovery Rate = stopa lažne detekcije

FS – filostratum

GO – Gene Ontology

LCA – engl. Last Common Ancestor = zadnji zajednički predak

MS – Microsoft

mtDNA – mitohondrijska deoksiribonukleinska kiselina

NCBI – National Center for Biotechnology Information

nr – nonredundant (ne-redundantne baze podataka)

OBO – Open Biomedical Ontologies

PNS – engl. Peripheral Nervous System = periferni živčani sustav

rDNA – rekombinantna deoksiribonukleinska kiselina

SPSS – Statistical Package for the Social Sciences = statistički skup alata za društvene znanosti

TF – transkripcijski faktor

1. UVOD

1.1. MAKROEVOLUCIJA I GENOMSKA FILOSTRATIGRAFIJA

Utemeljitelji tzv. „evolucijske sinteze“ ili „sintetičke teorije“ evolucije (Huxley 1942, Simpson 1949) razmišljaju o makroevoluciji kao rezultatu složenih i međusobno povezanih efekata mikroevolucije. Mayr i Provine (1980) u sažetku moderne teorije definiraju „makroevoluciju“ (tj. bilo kakav filogenetski razvoj iznad razine vrste ili nastanak viših taksona) kao postupni proces koji se odvija korak po korak i ne predstavlja ništa doli ekstrapolaciju „mikroevolucije“ (koja uključuje porijeklo „rasa“, „varijeteta“ i vrsta) (Kutschera i Niklas 2004). Makroevolucijske studije, dakle, usredotočene su na promjene koje se događaju na ili iznad razine vrste, po čemu se ona razlikuje od mikroevolucije, koja se odnosi na manje evolucijske promjene (obično opisane kao promjene u frekvencijama alela) unutar vrste ili populacije. Na razini makroevolucijskih procesa događale su se i adaptivne promjene koje su oblikovale sustave organa kod životinja.

Spoznaje u području makroevolucije tradicionalno su rezultat doprinosa paleontologije, komparativne morfologije i evolucijske razvojne biologije (tzv. „evo-devo“ pristup). Kao nova razina analize makroevolucijskih trendova javlja se komparativna genomika, a u njenom okviru, kao inovativni pristup, genomska filostratigrafija (Domazet-Lošo i sur. 2007).

Pristup genomske filostratigrafije započinje definiranjem filogenetskog stabla vrste za koju postoje genomski ili ekspresijski podaci, nakon čega slijedi postupak stratifikacije. Tim se postupkom svi geni unutar genoma odabrane vrste svrstavaju unutar skupova koji su definirani početnom filogenijom, a predstavljaju različite periode vremena. Ti su skupovi gena nazvani genomskim „filostratumima“. Nakon definiranja filostratuma slijedi statistička analiza podataka vezanih za pojedine gene. Konačno, rezultati analize se interpretiraju biološki i evolucijski, čime je moguće uočiti i objasniti trendove u evoluciji promatranog skupa gena (Domazet-Lošo i sur. 2007). Filostratigrafska analiza može se primijeniti na različite probleme na makroevolucijskoj razini, pa tako i na nastanak i razvoj organskih sustava.

1.2. DOSADAŠNJE SPOZNAJE O EVOLUCIJI ORGANSKIH SUSTAVA

1.2.1. EVOLUCIJSKI NASTANAK ŽIVOTINJA

Datiranjem starosti stijena tehnikama geokronologije utvrđeno je da je Zemlja nastala prije otprilike 4566 milijuna godina (Halliday 2001). Geološka prošlost Zemlje može se podijeliti na prekambrij, koji je trajao od formiranja Zemlje do prije otprilike 542 milijuna godina, te fanerozoik, koji slijedi iza njega i traje do danas. Život na Zemlji prvi put se javlja tijekom prekambrija, ali tek početkom fanerozoika dolazi do ubrzanog razvoja životinjskih koljena. Fanerozoik se dijeli na tri ere (paleozoik, mezozoik i kenozoik), a ukupno obuhvaća samo oko 15% geološke prošlosti Zemlje (Niklas 1997; Cowen 2000; Kutschera 2001; Kutschera i Niklas 2004).

Geološka i paleontološka istraživanja sugeriraju da se život po prvi puta pojavio prije oko 3,8 milijardi godina, nakon što je završio period tijekom kojeg je Zemlja neprestance bila bombardirana materijalom iz svemira (Halliday 2001, Kutschera i Niklas 2004). Najstariji prokariotski mikrofosili nađeni su u bazaltnim stijenama starosti otprilike 3465 milijuna godina (Apex Basalt, Australija), a bili su slični današnjim cijanobakterijama (Schopf 1993, 1999; Knoll 2003; Kutschera i Niklas 2004). Ti prvi organizmi bili su anaerobni heterotrofni prokarioti (Matoničkin i sur. 2009). Oksidativna fotosinteza (tj. fotosintetska proizvodnja molekularnog kisika) prvi puta se pojavila kod predaka današnjih cijanobakterija prije više od 2,7 milijardi godina (Björn 2008). Ovi fotoautotrofni organizmi oslobađali su kisik koji se prije oko 2,2 milijarde godina počeo nakupljati u atmosferi, te je naknadno znatno transformirati (Knoll 1999). Oksidativna atmosfera u velikoj je mjeri usmjerila daljnju evoluciju životinja.

Prvi eukariotski organizmi, s definiranom jezgrom okruženom vlastitom membranom, pojavili su se prije oko 2-1,5 milijarde godina, iako su ključni elementi eukariotske fiziologije vjerojatno evoluirali i ranije (Knoll 1999, 2003; Martin i Russell 2003; Kutschera i Niklas 2004). Najstariji poznati višestanični eukarioti bile su crvene alge roda *Bangiomorpha*, stare otprilike 1198 milijuna godina (Butterfield 2000).

Kako pokazuju fosili crvenih algi i drugih protista, prva velika divergencija eukariotskih organizama počela je najranije prije 1200-1000 milijuna godina (Sogin i Silberman 1998, Knoll 1992). Nekoliko skupina višestaničnih algi divergiralo je dosta rano, ali što se tiče životinja,

njihova moguća rana divergencija nije ostavila fosilnih tragova. Proterozoik (zadnji eon prekambrija) završava Ediakaranskim periodom (trajao od prije 635-542 milijuna godina), u kojem se javlja tzv. Ediakaranska fauna (Knoll i sur. 2004). Karakteristike slojeva starijih od 600 milijuna godina ukazuju da su životinje prije Ediakaranskog perioda, ako su uopće postojale, bile rijetki, maleni ili nježni oblici sa slabom mogućnošću fosilizacije. Ako se ikad nađu dokazi postojanja takvih organizama, to će vjerojatno biti fosfatizirani ostaci u karbonatnim stijenama iz neoproterozoika (posljednja era proterozoika, trajao od prije 1000-542 milijuna godina) (Zhang i sur. 1998; Xiao i sur. 1998; Li i sur. 1998; Knoll i Carroll 1999). Iako su višestanični eukarioti možda postojali prije milijardu godina (Knoll i sur. 2006), značajni uzlet u diverzifikaciji višestaničnih životinja dogodio se prije 700-600 milijuna godina, u doba dramatičnog povećanja količine atmosferskog i oceanskog kisika (Carroll 2001, King 2004, Knoll 2003, Maynard Smith i Szathmáry 1995, Pfeiffer i sur. 2001). Čini se da je kod životinja višestaničnost evoluirala samo jednom (Lake 1990, King 2004).

Prva era fanerozoika (paleozoik) započinje kambrijskim periodom (trajao od prije otprilike 542 do prije otprilike 488,3 milijuna godina), tijekom kojeg je došlo do intenzivnog razvoja višestaničnih organizama. Kambrijska radijacija je od pojave snažno skeletiziranih životinja (početkom kambrija) do prvih pravih fosila trilobita trajala nekih 20 milijuna godina, ali ukoliko krenemo s prvom opsežnom pojavom ihnofosila (fosiliziranih tragova životinja – još tijekom Ediakaranskog perioda) i promatramo razdoblje sve do kraja kambrija, radijacija je trajala nekih 65 milijuna godina (Marshall 2006). Zbog pojave velikog broja novih oblika životinja, kao i pojave u osnovi svih životinjskih koljena koja opažamo i danas, i to u okviru (evolucijski gledano) relativno kratkog vremenskog perioda, ovo razdoblje evolucije Metazoa poznato je i kao kambrijska „eksplozija“. Kambrijska eksplozija predstavlja radijaciju bilateralno simetričnih životinja (uz dodatak spužvi) sa suvremenim planovima tjelesne građe (Conway Morris 1998), tj. diverzifikaciju glavnih krunskih skupina unutar monofiletskih skupina koje su divergirale ranije, još prije početka kambrijske eksplozije (Balavoine i Adoutte 1998, Knoll i Carroll 1999). Prve bilateralno simetrične životinje vjerojatno su postojale mnogo prije početka kambrijske radijacije. Erwin i Davidson (2002) opisuju tri moguća scenarija divergencije zadnjeg zajedničkog pretka protostomičnih i deuterostomičnih životinja (LCA Bilateria), od kojih najraniji scenarij datira prije više od 750 milijuna godina. Najraniji fosilni tragovi Bilateria mogli bi biti mikrofosili kineske Doushantuo formacije, koji nalikuju embrijima suvremenih Bilateria, a

njihova starost procijenjena je na oko 570 milijuna godina (Xiao i sur. 1998; Xiao i Knoll 1999; Chen i sur. 2000). Pojava bilateralne simetrije bila je važan pokretački faktor kambrijske radijacije jer su morfogenetski procesi tijekom njihovog embrionalnog razvoja, kao i geni koji ih kontroliraju, evolucijski vrlo fleksibilni (Erwin i Davidson 2002).

Organski sustavi javljaju se kao odgovor na potrebe specijalizacije različitih dijelova tijela Metazoa. Životinjsko tijelo sastavljeno je od dijelova koji zadovoljavaju ove potrebe i ti se dijelovi općenito nazivaju organima ili organskim sustavima (Schmidt-Rhaesa 2007). Organi se obično definiraju kao strukture sastavljene od više od jedne vrste tkiva koje imaju određenu funkciju unutar tijela (Schmidt-Rhaesa 2007, Valentine 2004). Organski sustavi sastoje se od više od jednoga organa. Organi i organski sustavi mogu se smatrati modulima od kojih je izgrađeno životinjsko tijelo (Schmidt-Rhaesa 2007, Tyler 2003).

Međutim, takve definicije nikada ne pokrivaju cjelokupnu problematiku definiranja organa, jer jedan organ može imati više funkcija ili se njegova funkcija može mijenjati tijekom evolucije. Tako npr. koža može kod nekih životinja apsorbirati hranjive tvari ili kisik. Organi obično evoluiraju serijski, tako da najprije prolaze celularnu, pa tkivnu organizaciju, te se njihovi davni korijeni u evoluciji javljaju prije njih samih, zbog čega držanje za vrlo uske definicije može biti prepreka shvaćanju šire slike njihovog porijekla (Schmidt-Rhaesa 2007). Ovo je bitno imati na umu kod pokušaja da se objasni evolucijski nastanak nekog organskog sustava, posebno ukoliko se objašnjenje temelji na praćenju promjena učestalosti ekspresija gena unutar filogenetski definiranih vremenskih razdoblja, odnosno, na način na koji problemu pristupa genomska filostratigrafija.

1.2.2. EVOLUCIJA ORGANSKIH SUSTAVA

Tkiva od kojih se sastoji životinjsko tijelo dijele se prema svom embrionalnom porijeklu u tri skupine, koje se nazivaju zametnim listićima: to su ektoderm, endoderm i mezoderm. Porifera i Cnidaria imaju ektoderm i endoderm, dok je mezoderm, kao treći zametni listić, nađen kod Ctenophora (Martindale i Henry 1999, Rieger i Ladurner 2003) i Bilateria. Životinje koje imaju mezoderm su općenito voluminoznije organizacije, što im stvara nekoliko problema vezanih uz transport plinova, hrane i dr. tvari. Iz tog su razloga ove životinje morale razviti posebne organe (Schmidt-Rhaesa 2007).

1.2.2.1. Epidermalni sustav (epiderm)

Epiderm je tkivo koje posreduje između vanjskog okoliša i unutrašnjosti tijela. Uvijek je organiziran kao ploha stanica, najčešće jednoslojna, ali može imati i nekoliko slojeva stanica. Predak Metazoa vjerojatno je imao epiderm koji je sadržavao bazalni izvanstanični matriks, izvanstanični sluzavi omotač („glikokaliks“) i jednu trepetljiku po stanici (slika 1). Ovakav zaključak proizlazi iz činjenice da Porifera, *Trichoplax adhaerens* i Cnidaria imaju (uz rijetke iznimke) monocilijarne epidermalne stanice (Nielsen 1987, 2001), Acoelomorpha imaju samo ostatke matriksa (Tyler i Rieger 1999, Ehlers 1992a), a glikokaliks je opisan i kod Porifera (Bagby 1970, Harrison i de Vos 1991) i Cnidaria (Thomas i Edwards 1991). Osim toga, epiderm prvih Metazoa imao je međustanične spojeve u obliku *zonula adhaerens* i pregradnih spojeva (slika 1). Sve životinje osim Porifera imaju međustanične spojeve u obliku prijelaznih filamenata i dezmosoma. Kod Eumetazoa se javljaju međustanični kanali (nađeni kod žarnjaka (Wood 1985), ali ne i kod *Trichoplax adhaerens* i spužvi (Nielsen 2001)), te dezmosomi (Ruthmann i sur. 1986, Schmidt-Rhaesa 2007). Unutar izvanstaničnog matriksa kod Bilateria se razvila mreža vlaknaca od kolagena, laminina i proteoglikana koja se naziva bazalna ploha (lamina densa) (Ax 1996). Izlučivanjem molekula u matriks glikokaliksa nekoliko puta konvergentno je nastala kutikula. Hitin i kolagen, koji imaju u njoj najveći udio, već su imali razvijene metaboličke puteve kod pretka svih višestaničnih životinja (Schmidt-Rhaesa 2007). Na razvojnoj liniji vinske mušice hitinska kutikula se javlja kod pretka Ecdysozoa, skupine za koju je karakteristično i periodično presvlačenje (Aguinaldo i sur. 1997, Telford i sur. 2008) (slika 1).

1.2.2.2. Živčani sustav

Živčani sustav javlja se s pojavom Eumetazoa. Oblici provođenja signala, kao i neke molekularne komponente tipične za živčane sustave mogu se naći i kod Porifera (Weyrer i sur. 1999; Müller i Müller 1999; Larroux i sur. 2006, 2008), međutim kod Eumetazoa se po prvi puta javljaju živci prepoznatljivi na staničnoj razini (slika 1). Iako se u literaturi često navodi kako Cnidaria imaju homogeno distribuirane difuzne živčane mreže, već se i kod njih može zapaziti trend prema stvaranju koordinacijskih centara. Tako su npr. u *Hydra* uočeni točno određeni skupovi živčanih stanica sa specifičnim prostornim rasporedom (Grimmelikhuijzen i sur. 1989; Koizumi i sur. 1990). U bazi tentakula nekih vrsta *Hydra* identificirana je gusta anatomska struktura nazvana živčanim prstenom (Koizumi i sur. 1992). Naknadno je ovakva koncentracija nađena i na rubu zvona meduze roda *Aequorea* (Mackie 2004) i oko usnog otvora kod *Nematostella* (Marlow i sur. 2009). Živčani prstenovi smatraju se oblicima središnjeg živčanog sustava uključenima u koordinaciju ponašanja (Grimmelikhuijzen i Westfall 1995, Mackie 2004, Garm i sur. 2007, Koizumi 2007), zbog čega je otvorena mogućnost filogenetske povezanosti između procesa koji omogućavaju razvoj živčanih prstenova u Cnidaria i CNS-a u Bilateria (Galliot i sur. 2009). Također se u evoluciji može zapaziti trend od dvosmjernih sinapsi prema jednosmjernima, tj. prema usmjerenom provođenju informacija. Kod Bilateria se javlja tzv. ortogonalni živčani sustav (Hanström 1928, Reisinger 1972). To bi bio sustav nekoliko uzdužnih živčanih vrpce koje su poprečno povezane pseudometamernim kružnim komisurama, dok se blizu anteriornog dijela tijela nalazi koncentracija živčanih stanica u obliku „mozga“. Takav sustav bio bi autapomorfija Bilateria (Reisinger 1972), a budući da ga nalazimo kod Acoelomorpha, toj hipotezi u prilog ide njihov smještaj kao bazalne skupine u odnosu na ostale Bilateria. Unutar bilateralno simetričnih životinja došlo je nekoliko puta do redukcije mozga i longitudinalnih živaca (npr. kod Bryozoa, Brachiopoda, Phoronida, te pretka Deuterostomia), te razvoja drugačijih oblika mozga (npr. okoždrijelni prsten kod Nematoda, Nematomorpha i Scalidophora). Kod skupine Spiralia i konvergentno kod Arthropoda razvio se dorzalni mozak s kompaktnijom masom aksona, gotovo u obliku kakve plohe (slika 1) (Schmidt-Rhaesa 2007).

1.2.2.3. Respiratorni (trahealni) sustav

Gotovo sve životinje za svoj metabolizam trebaju kisik, iako kod nekih postoje i slučajevi tolerancije niske razine kisika, ili čak anaerobnih metaboličkih puteva (Schmidt-Rhaesa 2007). S povećanjem tjelesnog volumena raste potražnja tkiva za kisikom, a u isto vrijeme se smanjuje mogućnost njegove distribucije isključivo difuzijom, zbog čega su evoluirali optjecajni sustavi, optimizirano je primanje kisika preko nosača s visokim (ali i reverzibilnim) afinitetom za kisik, te je povećana sama površina za izmjenu plinova. Slijedeći korak, posebno za one koji su evoluirali bar djelomice usmjeren tok tjelesnih tekućina, bio je odvojiti posebni dio tijela gdje će se obavljati oksigenacija same krvi ili hemolimfe. U tim su se slučajevima razvile posebne respiratorne (dišne) strukture, i to generalno na način da što veća površina bude izložena vanjskom mediju, a u isto vrijeme na način da tkivo koje čini granicu između vanjskog medija i unutarnje cirkulacije bude što tanje (Schmidt-Rhaesa 2007).

Evolucijski gledano, teško je uspoređivati dišne sustave između viših taksonomskih kategorija životinja, jer su oni evoluirali kao odgovor na promjenu okolišnih uvjeta ili veličine organizma, što se događalo tijekom evolucije više puta. Tako su Polychaeta, Echinodermata i Crustacea evoluirali za izmjenu plinova izvrata kože, dok su Onychophora, Myriapoda, Araneae i Insecta razvili uzdušnice (traheje) koje su nastale kao uvrati kože (slika 1). Ovakve su strukture stoga ektodermalnog porijekla. S druge strane, dišne strukture svitkovaca (škrge i pluća, nastali kao derivati probavila, ili točnije, ždrijela) su endodermalnog porijekla (Rathke 1861; Gilbert 2006). Velik utjecaj na evoluciju dišnih sustava imale su i promjene u okolišu, posebno što se tiče prilagodbi na kopneni način života, npr. kod Gastropoda, kopnenih Arthropoda i Chordata (Schmidt-Rhaesa 2007).

Prisutnost trahealnog sustava kod Insecta i Myriapoda dugo je smatrana karakteristikom kojom su ove dvije skupine bile ujedinjavane u potkoljeno Tracheata („Atelocerata“ hipoteza – Heymons 1901), međutim strukturalna analiza uzdušnica nije dala argumente za njihovo zajedničko porijeklo (Hilken 1998), te je više molekularnih analiza utvrdilo blisku vezu Myriapoda i Chelicerata (rDNA: Friedrich i Tautz 1995, Min i sur. 1998; mtDNA: Hwang i sur. 2001; *Hox*-geni: Cook i sur. 2001; mitohondrijski geni: Hassanin 2006). Pancrustacea, takson koji ujedinjuje Crustacea i Hexapoda, trenutno je u zoologiji široko prihvaćen (Carapelli i sur. 2007), dok neki nalazi upućuju i na smještaj Hexapoda unutar Crustacea (npr. Ertas i sur. 2009).

1.2.2.4. Cirkulatorni (optjecajni) sustav

Cirkulatorni (optjecajni) sustavi nisu potrebni malenim ili epitelno organiziranim životinjama jer se prijenos tvari može obavljati procesima difuzije. Međutim, zbog povećanja veličine i složenosti, mnoge su životinje morale razviti neki vid prenošenja tvari unutar tijela. U tom je smislu definicija cirkulatornog sustava problematična, jer se ograničeno kretanje tjelesnih tekućina opaža već u intersticijskom prostoru izvanstaničnog matriksa, a već i takav tok može pomoći distribuciji tvari. Primarne i sekundarne tjelesne šupljine najboljeg su potencijala za tok fluida, zbog čega su to i najvažnije komponente optjecajnih sustava. Prijenos i distribucija su, pritom, učinkovitiji kada se odvijaju unutar ograničenih sustava u obliku dobro definiranih žila (Ruppert i Carle 1983, Schmidt-Rhaesa 2007). Zanimljivo, samo u četiri skupine (Nemertea, Cephalopoda, Hirudinea i Craniata) javljaju se žile obavijene vlastitim slojem epitelnih stanica (koji se naziva „endotel“), zbog čega se definiraju kao sekundarne (ili celomske) tjelesne šupljine (slika 1).

Općenito gledajući, postoji čvrsta veza između tjelesnih šupljina i optjecajnih sustava, jer se fluidi distribuiraju ili samim tjelesnim šupljinama ili epitelom ograničenim prostorima unutar primarne tjelesne šupljine (žilama). Unutar skupina Mollusca, Annelida i Deuterostomia (osim Tunicata) postoji tendencija od otvorenih prema zatvorenim sustavima. Međutim, na primjeru Arthropoda vidi se da to nije univerzalni trend, jer je njihov optjecajni sustav vrlo slabo razvijen. Slaba razvijenost optjecajnog sustava kod člankonožaca posljedica je njegove smanjene funkcije, jer člankonošci ekstenzivno razvijenim trahealnim sustavom dovode kisik izravno u stanice. Tjeranje fluida kroz organizam postiže se akcijom mišića, pri čemu se takve mišićne strukture mogu razviti toliko da ih nazivamo „srca“. Ekspresija homolognih gena u *Drosophila* i Craniata (Bodmer i Venkatesh 1998, Tanaka i sur. 1999) ukazuje na mogućnost da je njihov zadnji zajednički predak (LCA Bilateria) imao optjecajni sustav koji je uključivao kontraktilnu žilu (De Robertis i Sasai 1996) (slika 1). Međutim, postoji i mogućnost da su odgovarajući geni bili prisutni u zajedničkom pretku, ali su imali ili različite funkcije ili su regulirali neke vrlo osnovne stanične procese (Schmidt-Rhaesa 2007).

1.2.2.5. Rasplodni (reproduktivni) sustav

Što se tiče razmnožavanja, višestanične životinje su vrlo raznolike. Ima ih aseksualnih, partenogenetskih, seksualnih sa ili bez gonada, dvospolnih i odvojenog spola, raznih seksualnih obrazaca ponašanja s raznolikim sustavima za prijenos i primanje gameta. Partenogeneza je kao osobina izvedena od spolnog načina razmnožavanja i češća je od razmnožavanja fragmentacijom. Unutar Bilateria partenogeneza je evoluirala nekoliko puta nezavisno. Gonade nisu nužno mjesto gdje nastaju gamete; one mogu biti samo mjesto njihova sazrijevanja. Gamete se mogu formirati vrlo rano (preformacija) ili relativno kasno tijekom razvoja (epigeneza) (Nieuwkoop i Sutasurya 1979, 1981, Extavour i Akam 2003; Schmidt-Rhaesa 2007).

Extavour i Akam (2003) zaključuju da je epigeneza češći i rasprostranjeniji način određivanja stanica germinativne linije nego što je to preformacija, te bi mogla predstavljati ancestralni mehanizam segregacije stanica germinativne linije kod ranih višestaničnih životinja. Njihov zaključak je u suprotnosti sa široko prihvaćenim stajalištem u polju razvojne biologije (npr. Wolpert 1998) da je epigenetska determinacija iznimka, te da većina životinja koristi lokalizirane citoplazmatske odrednice za specifikaciju germinativne linije. Ovakvo stajalište moglo bi biti pristrano jer je naše znanje o organizmima kod kojih dolazi do preformacije gameta vrlo detaljno, budući da su mnogi od njih modelni organizmi u biologiji (npr. *Caenorhabditis elegans*, Nematoda, *Drosophila* spp., Insecta). Istovremeno, preformacija gameta ima genetičkih prednosti pred epigenezom jer se ranim odvajanjem stanica germinativne linije smanjuje mogućnost pojave potencijalno štetnih mutacija.

Spolno, kao i nespolno razmnožavanje pojavili su se prije pojave Metazoa. Gonade su različitog porijekla, pa je moguće da su evoluirale nekoliko puta. Prijelaz s vanjske na unutarnju oplodnju na mnogo je načina elaborirao reproduktivne sustave (Schmidt-Rhaesa 2007).

1.2.2.6. Mišićni (muskulatorni) sustav

Mišići su organi sposobni za kontrakcije, pa su uključeni u kretanje organizma, kao i kretanje unutarnjih dijelova tijela, kao što su probavilo i srce. Osnova za kontrakcije mišića, sustav aktin-miozin, javlja se u evoluciji prije pretka svih višestaničnih životinja (imaju ga svi eukarioti,

npr. alga *Nitella* (Sheetz i Spudich 1983) ili pak *Acanthamoeba* (Adams i Pollard 1986)). Kod Metazoa mišići se najprije javljaju kao epitelno-mišićne stanice, dok je kasnije unutarstanični sustav aktin-miozin evoluirao prema međustaničnom sustavu (slika 1). Mišići su nastali kao efektivne kontraktilne jedinice unutar kojih se mobilna komponenta (proteini miozinske porodice) kreće u odnosu na fiksnu komponentu (citoskelet izgrađen od proteina aktinske porodice). Za to je bila važna evolucija tzv. sarkomera, koje se unutar mišića mogu prepoznati kao osnovne jedinice sposobne za kontrakciju. Specifičan uzorak slaganja aktinskih i miozinskih filamenata unutar sarkomere omogućio je da se snaga kontrakcije prenosi i izvan stanice, što je bilo ključno za razvoj odvedenijih sustava za kontrakciju. Kod Porifera se javlja poseban tip stanica s obogaćenim tipom aktina (miociti – mogu stvarati sfinktere oko oskuluma spužvi – Bagby 1966), a kod Cnidaria se stanice sposobne za kontrakciju nalaze kao sastavni dio njihovog epitelijalno organiziranog tijela, pa se nazivaju „epitelno-mišićne stanice“. To su u osnovi epitelne stanice koje pri svojoj bazi koncentriraju aktinske i miozinske filamente (Schmidt-Rhaesa 2007). Kod dijela Cnidaria neke stanice koje sadrže miofilamente izgubile su vezu s epidermom, te se nazivaju „mišićna vlakna“ (engl. „fibre muscle cells“) ili „miociti“ (Lesh-Laurie & Suchy 1991). Tip mišića određen je načinom na koji su unutar mišića poredane sarkomere, npr. glatki mišići imaju neuređen uzorak sarkomera, dok poprečno-prugasti mišići imaju sarkomere postavljene uzduž longitudinalne osi stanice, što im zbog preklapanja miofibrila daje „prugasti“ izgled. Kod Bilateria javlja se kontinuirani sloj mišića ispod subepidermalnog izvanstaničnog matriksa, s vanjskim kružnim i unutrašnjim longitudinalnim mišićima, u obliku kompleksa koji se naziva „kožno-mišićni sloj“ (njem. *Hautmuskelschlauch*) (slika 1). Ovakav raspored je u različitim oblicima široko rasprostranjen kod životinja bez čvrstog potpornog sustava, gdje se oslanja na hidrostatski tlak tjelesnih tekućina (Schmidt-Rhaesa 2007), dok pojavu čvrstog potpornog sustava prati redukcija kožno-mišićnog sloja i specijalizacija pojedinih mišića. Tako je npr. kod Arthropoda kožno-mišićni sloj snažno modificiran, te se javljaju poprečno-prugasti mišići (slika 1).

1.2.2.7. Probavni sustav

Evolucija probavila jedna je od prvih posljedica višestaničnosti. Višestaničnost je omogućila razvoj specijaliziranih tipova stanica: zahvaljujući selektivnim pritiscima formirali su se vanjski zaštitni sloj (ektoderm) i unutrašnji sloj (endoderm) uključen u apsorpciju hrane

(Stainier 2005). Životinjska hrana vrlo je raznolika sastavom i veličinom, ali se mogu općenito razlikovati tri procesa: pribavljanje hrane, rastvaranje hrane na sitne čestice, te apsorpcija (endocitoza) takvih čestica u organizam. Od ta tri procesa spužve (kao najprimitivniji Metazoa) obavljaju samo dva: pribavljanje hrane (stvaranjem struje vode kroz tijelo) i apsorpciju (endocitoza sitnih čestica). One (uz iznimku roda *Asbestopluma* – Vacelet & Boury-Esnault 1995, Vacelet 2006) ne mogu koristiti veću hranu, jer bi to zahtijevalo prisutnost tkiva (organa) za mehaničku i/ili kemijsku razgradnju. Kemijska razgradnja evoluirala je prva, i to na način da su nastale dobro definirane strukture odvojene od vanjskog okoliša u koje se mogao lučiti koncentrirani probavni sok s enzimima za razgradnju (Schmidt-Rhaesa 2007).

Najčešći način ontogenetskog razvoja probavnog trakta je invaginacijom šuplje blastule, čime se stvaraju pracijsko („arhenteron“) i prausta („blastopora“). Jedna od glavnih značajki po kojoj se Metazoa razlikuju od kolonijalnih Protista jest razvoj putem embriogeneze kojim se stvara nekoliko slojeva stanica. Proces u kojem se to događa je gastrulacija (Leys i Eerkes-Medrano 2005). Gastrulacija u svojem najširem smislu predstavlja reorganizaciju stanica blastule kojom nastaje višeslojni embrio, gastrula (Brusca i sur. 1997). Iako stvaranje zametnih listića obično znači i stvaranje probavila, općenito se smatra kako Porifera nemaju probavilo niti u odraslom niti u ličinačkom stadiju (Leys i Eerkes-Medrano 2005). Iako su mnoga istraživanja pokazala kako se gastrulacija kod životinja može odvijati na vrlo raznolike načine (Gilbert i Raunio 1997), gastrulacija putem invaginacije, kojom se stvara endoderm, ili probavilo, još se uvijek smatra ancestralnim načinom stvaranja zametnih listića (Wolpert 1992, Denis 1997, Nielsen 2001, Arendt 2004). Međutim, također je dugo smatrano da je među bazalnim Metazoa ingresija, a ne invaginacija, češći način stvaranja zametnih listića (Metschnikoff 1874, Lankester 1877), te kako LCA Metazoa nije nužno posjedovao probavilo (Price i Patel 2004). Porifera su neobične životinje jer njihova tkiva okružuju seriju kanalića i šupljina u kojima se iz vode filtrira hrana. Međutim, reorganizacija tkiva ingresijom ili delaminacijom kojom nastaju višeslojne ličinke jest prisutna u embriogenezi više skupina Porifera, te se smatra da predstavlja gastrulaciju (Efremova 1997, Boury-Esnault i sur. 1999, Leys i Degnan 2002, Leys 2004).

Budući da se probavni trakt uočava kod Cnidaria i Ctenophora, općenito se smatra kako je probavilo evoluiralo u pravom smislu u pretku Eumetazoa (Schmidt-Rhaesa 2007). Eumetazoa imaju probavni sustav kao odjeljak unutar tijela koji je posvećen isključivo razlaganju hrane (slika 1). Kod Bilateria nalazimo tri osnovna tipa probavila: u obliku vrećice s jednim otvorom

(Platyhelminthes i Gnathostomulida), u obliku probavnog sincitijalnog tkiva (Acoelomorpha), te u obliku cijevi s usnim, kao i analnim otvorom (jednosmjerno, prohodno probavilo – ostali). Dva su osnovna scenarija za evoluciju prohodnog probavila, ovisno o tome smatramo li da je predak Bilateria imao prohodno ili vrećasto probavilo. Ukoliko je prohodno probavilo evoluiralo već kod LCA Bilateria, kod Acoelomorpha je došlo do redukcije, dok je vrećasti oblik nastao sekundarno kod Gnathostomulida i Platyhelminthes (slika 1, scenarij označen indeksom ²). To se moglo dogoditi ukoliko je u stadiju gastrule (gdje je praprijeko vrećastog oblika) došlo do zastoja u razvoju, pri čemu je odrasla životinja zadržala vrećasti oblik. Međutim, ukoliko je vrećasti oblik bio pleziomorfija Bilateria, prohodnost je morala evoluirati više puta nezavisno: kod LCA Deuterostomia, LCA Bryozoa i Syndermata, te Gastrotricha, Entoprocta, Spiralia i Ecdysozoa (slika 1, scenarij označen indeksom ¹). S obzirom na očite prednosti prohodnog probavila (specijaliziranija obrada hrane, kao i učinkovitije iskorištavanje sve raznolikijih oblika hrane), ovaj je scenarij također otvoren (Schmidt-Rhaesa 2007).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovoga rada je koristeći genomske i ekspresijske podatke vinske mušice (*Drosophila melanogaster*) metodom genomske filostratigrafije dobiti uvid u nastanak i razvoj organskih sustava kod životinja.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. GENOMSKA FILOSTRATIGRAFIJA KAO METODA

Ovaj se rad temelji na metodama koje su razvili Domazet-Lošo i sur. (2007), kao i podacima koji su iz njihovog rada proizašli (uz osvježenu NCBI nr bazu podataka i dodatak još jednog čvora na filogeniji). Stoga je nužno, prije dokumentiranja metoda koje su korištene u ovome radu, detaljnije iznijeti teoriju na kojoj se sama filostratigrafija temelji.

Pojam genomske filostratigrafije vezan je uz tzv. gene bez podrijetla (engl. „orphan genes“), protein-kodirajuće regije genoma koje nemaju poznatog homologa u evolucijski udaljenim skupinama (Domazet-Lošo i Tautz 2003). Geni bez podrijetla su po definiciji nastajali tijekom evolucije pripadajućih razvojnih linija i to vjerojatno u kontekstu prilagodbi specifičnih za tu razvojnu liniju (Domazet-Lošo i sur. 2007). Filostratigrafija pretpostavlja da su geni bez podrijetla nastajali tijekom cijele evolucijske prošlosti, pri čemu su značajnim udjelom zadržali funkcionalnost gena od kojih su nastali. Unutar svake evolucijske epohe nastao je određeni broj novih gena (pragena ili gena utemeljitelja, engl. „founder genes“). Prema filogenetskoj pojavi njihovih gena utemeljitelja, filostratigrafija omogućuje raspodjelu svih gena nekoga organizma unutar određenog broja skupina. Te se skupine gena nazivaju filostratumima, a njihov broj ovisit će o izboru filogenije, tj. o broju čvorova na filogenetskom stablu organizma kojeg analiziramo.

Raspodjela gena u filostratume vrši se postupkom stratifikacije, u kojem se genomske sekvence organizma od interesa uspoređuju u svakom čvoru filogenije sa sekvencama organizama u bočnim (lateralnim) granama stabla. Pretrage se vrše upotrebom programskog alata BLAST (Altschul i sur. 1990, 1997), koji uspoređuje sekvence i ocjenjuje stopu njihove podudarnosti, što nam omogućuje da procijenimo njihovo filogenetsko porijeklo. Svrstavanjem gena u filostratume, koji odgovaraju definiranim evolucijskim razdobljima, nastaje genomska filostratigrafska mapa.

3.2. PRIMJENA FILOSTRATIGRAFSKE MAPE U OVOME RADU

Domazet-Lošo i sur. su (2007) na primjeru podjele tkiva na zametne listiće pokazali način na koji se metoda filostratigrafije može upotrijebiti za rješavanje raznolikih bioloških pitanja na raznim razinama filogenetske hijerarhije. Oni su pronašli podatke za ekspresije 4141 gena dobivene *in situ* hibridizacijama u *Drosophila* embrijima i podatke o karakteristikama gena iz

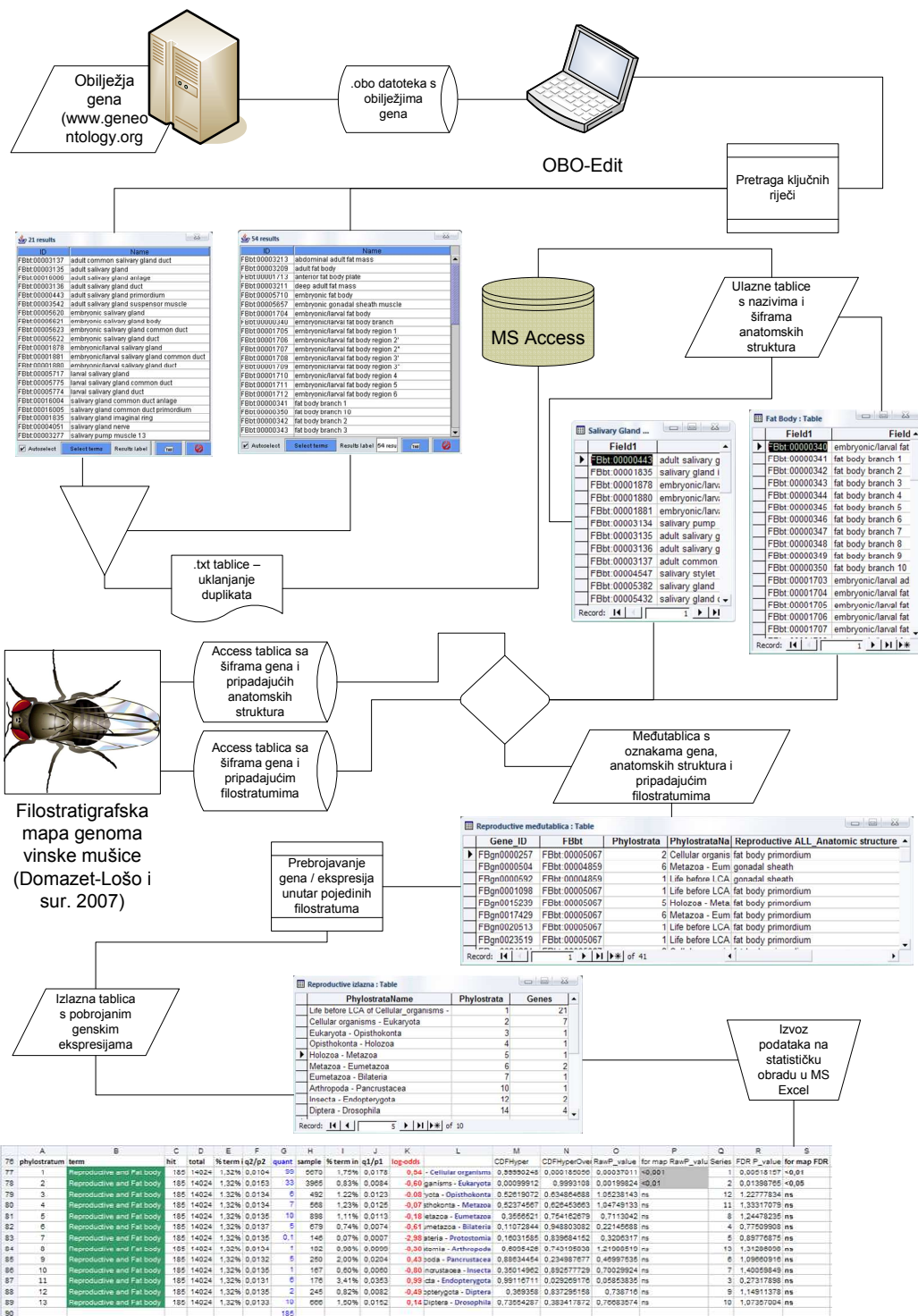
projekta genoma vinske mušice (Carroll 2005), te su oko 200 anatomskih termina korištenih za obilježavanje (anotaciju) ekspresijskih događaja razvrstali prema njihovom porijeklu od zametnih listića (ektoderm, endoderm i mezoderm). Pritom su koristili FlyBase kontrolirani vokabular dostupan na <http://flybase.net/data/docs/bodyparts-cv.txt>. Kako bi usporedili frekvencije anotiranih gena unutar pojedinih filostratuma, koristili su funkcionalna obilježja (anotacije) iz GO baze podataka (dostupne na <http://www.geneontology.org>). Odstupanja od očekivanih frekvencija ekspresijskih događaja testirali su pomoću dvosmjernog (engl. „two-tailed“) hipergeometrijskog testa s Bonferroni korekcijom (razina značajnosti $\alpha = 0,025$) (Castillo-Davis i Hartl 2003) kako bi uočili da li postoje značajna odstupanja u broju genskih ekspresija za pojedine zametne listiće.

Na sličan način moguće je ovom metodom analizirati evolucijski razvoj bilo kojeg podskupa genskih ekspresija koje nas zanimaju, pa tako i onih koje određuju organske sustave. U ovome radu primijenjeni su podaci iz filostratografske mape *Drosophila* genoma s originalno 12 filostratuma, kojima je dodan još jedan filogenetski čvor, tako da su organski sustavi analizirani na mapi s 13 filostratuma. Također je u odnosu na mapu koju su izradili Domazet-Lošo i sur. (2007) osvježena i korištena NCBI nr baza podataka. Skupovi gena čije ekspresije su uključene u pojedine organske sustave dobiveni su korištenjem programskog alata OBO-Edit.

Ovaj programski alat razvijen je pod okriljem projekta OBO („Open Biomedical Ontologies“). Cilj projekta je kontroliranim riječnikom klasificirati obilježja gena i njihovih produkata unutar baze podataka koja bi pokrivala sve živuće vrste. Kako bi se olakšalo pronalaženje podataka, unutar projekta su razvijeni različiti alati. Gene Ontology projekt, kao dio šireg OBO projekta, ima za cilj definirati određene izraze koji predstavljaju svojstva genskih produkata, te za njih napraviti ontologiju. Općenito, *ontologija* je formalni prikaz skupa koncepata unutar nekog područja (*domene*) i njihovih međusobnih veza. Pomoću alata OBO-Edit se različite ontologije mogu prikazivati i mijenjati, te je omogućeno sveobuhvatno pretraživanje obilježja gena. Ontologija genskih produkata pokriva tri domene: komponente stanice, molekularne funkcije i biološki procesi. Svako obilježje gena ima definirane veze s drugim obilježjima unutar iste domene, te ponekad unutar drugih domena. Ovakva struktura podataka omogućila je da u ovome radu pojedini organski sustavi vinske mušice budu opisani pomoću skupova anatomskih struktura od kojih se sastoje.

Kako bi se pronašao što reprezentativniji skup struktura, unutar alata OBO-Edit napravljen je velik broj pretraga pomoću ključnih riječi za pojedine organske sustave. Rezultate pretraživanja OBO-Edit prikazuje u obliku tablice s dva stupca: u prvom stupcu nalazi se identifikacijski broj anatomske strukture (npr. „FBbt:00005059“), a u drugom njezin naziv (npr. „garland cell“). Rezultati dobiveni pretragama različitih ključnih riječi kopirani su u zajedničku tekstualnu datoteku iz koje su uklonjeni eventualni duplikati. Na taj su način različiti organski sustavi predstavljeni skupom karakterističnih anatomskih struktura.

Kako bi se mogla napraviti analiza organskih sustava na filostratigrafskoj mapi, ove su se anatomske strukture morale povezati s pripadajućim genskim ekspresijama, te s filostratumom unutar kojeg se te ekspresije javljaju. Stoga su tablice struktura dobivene pretraživanjem OBO baze podataka uvezene u MS Access bazu podataka, gdje su povezane s tablicama koje su izradili Domazet-Lošo i sur. (2007), a koje su sadržavale nedostajuće podatke. Nakon toga su unutar baze podataka stvoreni SQL upiti (engl. „query“) pomoću kojih su iz ulaznih podataka stvorene nove tablice. Ovako dobivene tablice sadržavale su sve podatke potrebne za analizu određenog skupa anatomskih struktura (odnosno, organskog sustava ili nekog njegovog dijela) na već postojećoj filostratigrafskoj mapi genoma *Drosophila melanogaster*: identifikacijski broj gena, identifikacijski broj anatomske strukture unutar koje je gen eksprimiran, broj i ime filostratuma unutar kojeg se pojavila ekspresija tog gena u toj anatomskej strukturi i naziv te anatomske strukture. Za analizu podataka iz ovakve tablice na filostratigrafskoj mapi bilo je potrebno još prebrojati koliko je gena pokazalo svoje ekspresije unutar pojedinih filostratuma, što je također napravljeno upotrebom jednostavnih upita unutar MS Access baze. Na kraju su podaci iz tablica s prebrojanim genskim ekspresijama prebačeni u MS Excel proračunsku tablicu, gdje je slijedila statistička obrada (analiza) dobivenih podataka na filostratigrafskoj mapi (slika 2).



Slika 2. Shematski prikaz postupaka za dobivanje podataka potrebnih za statističku analizu organskih sustava na filostratografskoj mapi *Drosophila melanogaster*. Obilježja gena dostupna online učitana su u obliku .obo datoteke u programski alat OBO-Edit. Unutar programa je baza podataka obilježja gena pretraživana pomoću ključnih riječi kako bi se dobio popis anatomske strukture povezanih s organskim sustavom od interesa. Tablice dobivene pretragama različitih ključnih riječi su spojene i iz njih uklonjeni eventualni duplikati, te su u .txt obliku prebačene u MS Access bazu podataka (ulazne tablice na slici). Tamo su njihovi podaci povezani s podacima iz filostratografske mape vinske mušice koju su izradili Domazet-Lošo i sur. (2007). Na taj način dobivene su tablice s popisom gena (tj. njihovih identifikacijskih brojeva), odgovarajućih anatomske strukture i filostratumima unutar kojih su ti geni imali svoje ekspresije. Geni su nakon toga prebrojani unutar pojedinih filostratumima, te su podaci izvezeni na obradu u MS Excel.

U svrhu analize evolucijske prošlosti pojedinih organskih sustava, prebrojavano je koliko puta je pojedini gen iz skupa gena koji određuju sustav od interesa bio eksprimiran u pojedinom filostratumu. Pritom je ključna pretpostavka bila kako velik broj ekspresija gena koji određuju neki organski sustav unutar nekog filostratuma može ukazati na to da se u odgovarajućem periodu evolucijske prošlosti tog organskog sustava dogodila neka važna adaptivna promjena. Ukoliko je gen bio povezan s više od jedne anatomske strukture, tj. ukoliko je imao više funkcija (pleiotropnost), bilježen je (tj. broj) unutar filostratuma više puta. Drugim riječima, prebrojavane su različite ekspresije gena unutar pojedinih filostratuma. Ovaj je proces izveden unutar MS Access baze podataka, nakon čega su dobiveni podaci analizirani u MS Excel proračunskim tablicama.

Unutar proračunskih tablica podaci o broju ekspresija gena po filostratumima za promatrano svojstvo analizirani su statistički, kako bi se dobio odgovor na pitanje je li određen broj ekspresija unutar vlastitog filostratuma veći ili manji od očekivanog broja. U slučaju da se radi o nasumičnim fluktuacijama, bilo bi za očekivati kako će frekvencije ekspresija unutar pojedinih filostratuma otprilike odgovarati frekvencijama unutar čitavog uzorka gena vinske mušice. Drugim riječima, ako je odgovarajući filostratum imao veći udio gena u čitavom genomu, očekivali bismo da i naš uzorak ima u tom filostratumu veći broj gena. Ako prikažemo ove frekvencije na logaritamskoj ljestvici (y-os), a na x-osi prikažemo filostratume (tj. evolucijsko vrijeme), u slučaju gdje bi fluktuacije našeg uzorka odgovarale fluktuacijama u čitavom uzorku, dobili bismo graf koji bi se poklapao sa x-osi, tj. imao bi logaritamsku vrijednost nula. Ta je vrijednost uzeta za „očekivanu vrijednost“, nakon čega je trebalo izračunati je li naš uzorak unutar pojedinih filostratuma imao veću ili manju vrijednost od očekivane. Ako je logaritam očekivanja bio veći od nule, promatrani uzorak ekspresija bio je unutar tog filostratuma zastupljen više od očekivanja (tj. *overreprezentiran*). U suprotnom, bio je zastupljen manje od očekivanja (tj. *underreprezentiran*).

Pri računanju zastupljenosti nekog uzorka gena (u našem slučaju organskog sustava ili pak nekog dijela organskog sustava), unutar pojedinog filostratuma moglo se uočiti 4 tipa gena: (1) geni koji pripadaju našem uzorku, a nalaze se u filostratumu ($q1$); (2) geni koji **ne** pripadaju našem uzorku, a nalaze se u filostratumu (ostatak gena tog filostratuma; $p1$); (3) geni koji pripadaju našem uzorku, ali se **ne** nalaze u promatranom filostratumu (geni uzorka u ostalim filostratumima; $q2$); (4) geni koji niti pripadaju našem uzorku, niti promatranom filostratumu

(p_2). Zastupljenost se pritom računa kao prirodni logaritam omjera (q_1/p_1)/(q_2/p_2) (Sokal i Rohlf 1995). Dobivene *log-odds* vrijednosti pokazuju devijacije frekvencija ekspresija našeg uzorka od frekvencija u cjelokupnom uzorku i one su grafički prikazane na y-osi, dok su na x-osi prikazani pojedini filostratumi. Statistička značajnost svake *log-odds* vrijednosti izračunata je dvosmjernim hipergeometrijskim testom pomoću programskog alata SPSS (<http://www.spss.com>), čime je svakoj od njih dodijeljena određena P-vrijednost. P-vrijednost je vjerojatnost da će varijabla kao posljedica slučajnosti poprimiti vrijednost veću ili jednaku od uočene vrijednosti. Dobivene P-vrijednosti podvrgnute su FDR-korekcijama i kao takve su pridodane iznad grafičkog prikaza. Ispod grafičkog prikaza fluktuacija ekspresija po filostratumima dodana je filogenija prema kojoj je napravljena filostratigrafska mapa. Ovakav grafički prikaz predstavljao je statističku analizu genskih ekspresija sustava od interesa u odnosu na cijeli genom vinske mušice, drugim riječima, statističku analizu sustava na filostratigrafskoj mapi njezinog genoma.

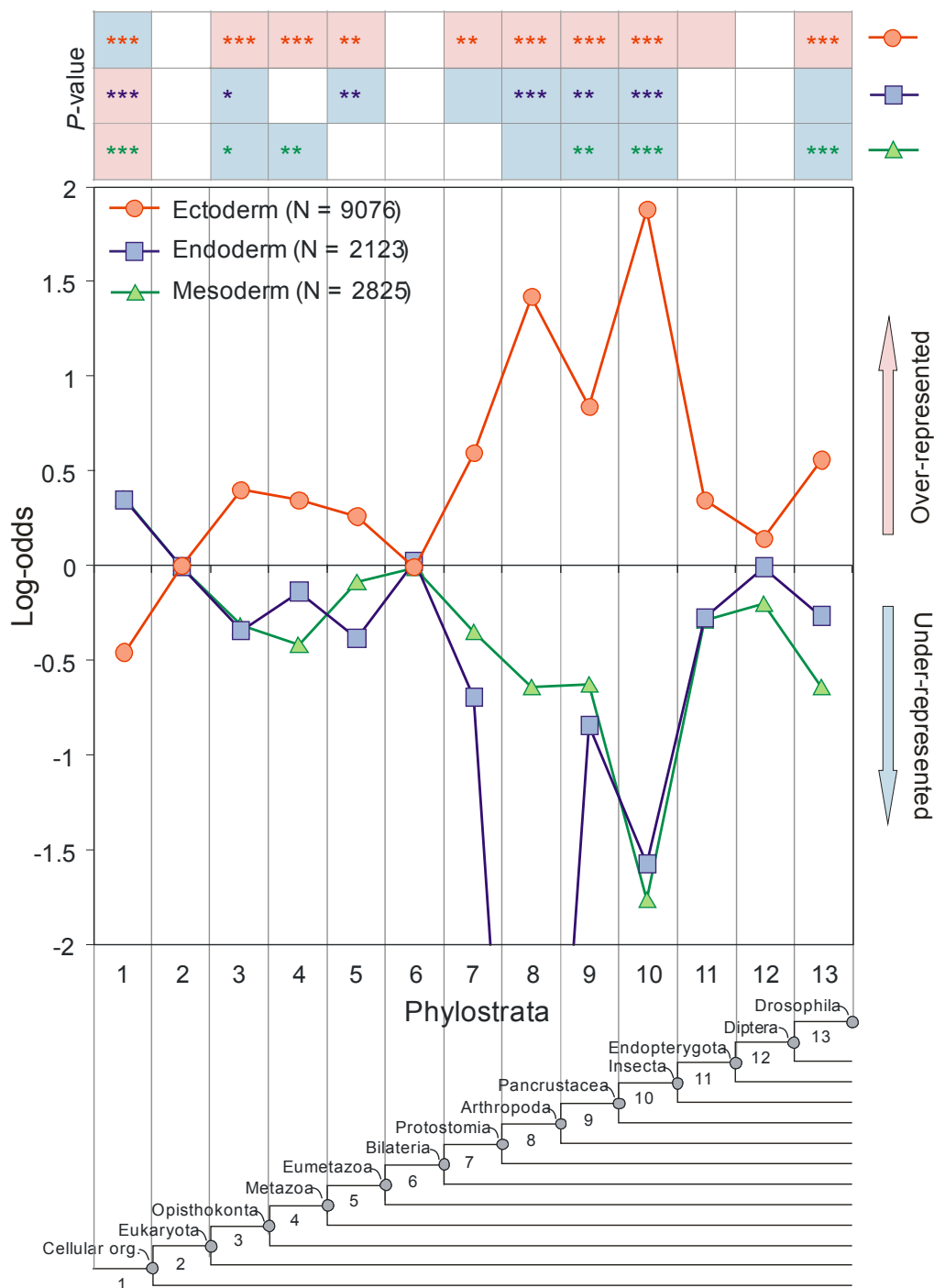
Na ovaj način su u radu obrađeni različiti uzorci (setovi) gena: najprije onih čije ekspresije određuju zametne listiće (ektoderm, endoderm i mezoderm), zatim organske sustave ektodermalnog, endodermalnog, mezodermalnog i miješanog porijekla, te pojedine komponente organskih sustava (npr. središnji i periferni živčani sustav). Statistički značajna odstupanja od očekivanih vrijednosti unutar nekog filostratuma ukazivala su na različite adaptivne tendencije, a posebno su bila zanimljiva ona kojima je bilo moguće pridati biološki značaj.

4. REZULTATI

4.1. ZAMETNI LISTIĆI: EKTODERM, ENDODERM I MEZODERM

Kod *Drosophila melanogaster* su anatomske strukture ektoderma, endoderma i mezoderma predstavljene s ukupno 14024 genskih ekspresija. Od tog broja 9076 ekspresija pripada ektodermu, 2123 endodermu, a 2825 mezodermu (slika 3).

Statistička analiza pokazuje da se većina pozitivnih odstupanja od očekivanih vrijednosti odnosi na ektoderm. Jedini filostratum (FS) u kojem je ektoderm zastupljen manje od očekivanja je FS 1 (LCA svih staničnih organizama), a to je također jedini FS u kojem su endoderm i mezoderm zastupljeni s više ekspresija od očekivanoga. To bi značilo da su endoderm i mezoderm uglavnom predstavljeni ekspresijama starih gena, koji su većinom nastali već pojavom prvih stanica. U evolucijskim razdobljima koja su uslijedila javljali su se novi geni unutar endoderma i mezoderma uglavnom manje nego što je bilo za očekivati u odnosu na cijeli uzorak. S druge strane, ektoderm na analizi pokazuje obrnuti trend, jer većina njegovih ekspresija su ekspresije filogenetski mlađih gena. U FS 6, u kojem su nastali Bilateria, nijedan od tri zametna listića ne odstupa od očekivanih vrijednosti za cjelokupan uzorak, što ukazuje da su u tom periodu evolucijske prošlosti geni nastajali otprilike jednakim intenzitetom u ektodermu, endodermu, kao i mezodermu.



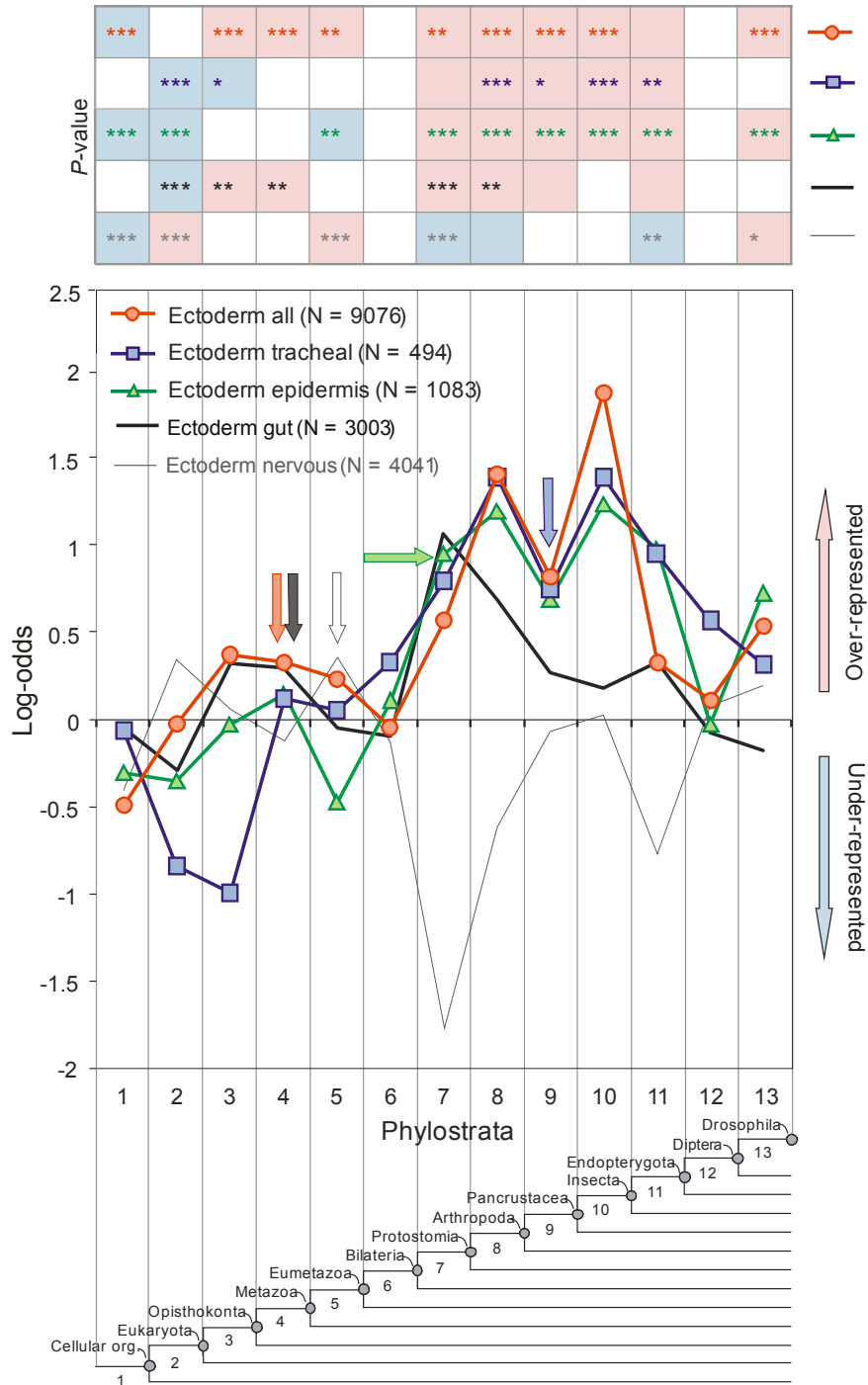
Slika 3. Statistička analiza ekspresije zametnih listića (ektoderm, endoderm i mezoderm) na filostratigrafskoj mapi genoma *Drosophila melanogaster*. Trinaest filostratuma koji odgovaraju filogenetskim međučvorovima (internodijima – niže na prikazu) obrubljeni su vertikalnim linijama i označavaju skupine gena koji vuku svoje porijeklo iz odgovarajućih evucijskih perioda. U svakom filostratumu se učestalost (frekvencija) ekspresijskih domena u anatomskim strukturama nastalih od ektoderma (crveno), endoderma (plavo) i mezoderma (zeleno) uspoređuje s učestalošću cijelog uzorka, a devijacije su prikazane pomoću *log-odds* (y-os). *Log-odds* vrijednosti nula znači da se frekvencije ekspresija u filostratumu i u cijelom uzorku ne razlikuju, dok pozitivne i negativne vrijednosti upućuju na, redom, veću zastupljenost od očekivanja (*overreprezentaciju*) ili manju zastupljenost od očekivanja (*underreprezentaciju*). Značajnost devijacija prikazana je u tablici s *P*-vrijednostima (gornji dio prikaza; **P* < 0,05; ***P* < 0,01, ****P* < 0,001; dvosmjerni hipergeometrijski test s FDR-korekcijom za višestruko testiranje prema broju filostratuma). Značajna su odstupanja u gornjem panelu označena blijedocrvenom (pozitivna) ili svijetloplavom (negativna) bojom. Odstupanja koja su izgubila značajnost primjenom FDR-korekcija označena su obojenim poljima bez zvjezdica. U legendi iznad krivulja prikazani su ukupni brojevi ekspresija za ektoderm, endoderm, odnosno mezoderm.

4.2. EKTODERM

Ektoderm je kod vinske mušice predstavljen s ukupno 9076 genskih ekspresija, kao što to prikazuje analiza na slici 4. Ektodermalnog su porijekla epiderm, trahealni sustav, dio probavnog sustava, što uključuje i akcesorne organe kao što su Malpighijeve cjevčice i slinske žlijezde, te živčani sustav, koji uključuje i osjetila.

Analiza ekspresija koje pripadaju ektodermalnim sustavima pokazala je da se općenito gledano trendovi u ekspresijama ovih sustava poklapaju s trendovima koje pokazuje ektoderm u cijelosti. Tako se od nastanka prvih staničnih organizama do pojave Bilateria (FS 1-6) ekspresije ovih sustava javljaju uglavnom s manjom učestalošću od očekivane, dok se od nastanka Protostomia do pojave *Drosophila* (FS 7-13), uz izuzetak živčanog sustava, javljaju s učestalošću koja je veća od očekivane. Čini se kako su ekspresije živčanog sustava uglavnom rezultat evolucijski starijih gena, što pokazuju i značajno više zastupljenosti ekspresija u odnosu na očekivane vrijednosti u FS 2 (LCA Eukaryota) i 5 (LCA Eumetazoa), dok mlađi FS, posebno 7 (LCA Protostomia), 8 (LCA Arthropoda) i 11 (LCA Endopterygota) pokazuju vrijednosti niže od očekivanih.

Detaljnije su pojedini organski sustavi ektoderma analizirani u daljnjem tekstu, pri čemu je probavni sustav, koji je s obzirom na zametne listiće miješanog porijekla, analiziran posljednji (vidjeti poglavlja 4.5., 4.6., 4.7. i 4.11.).

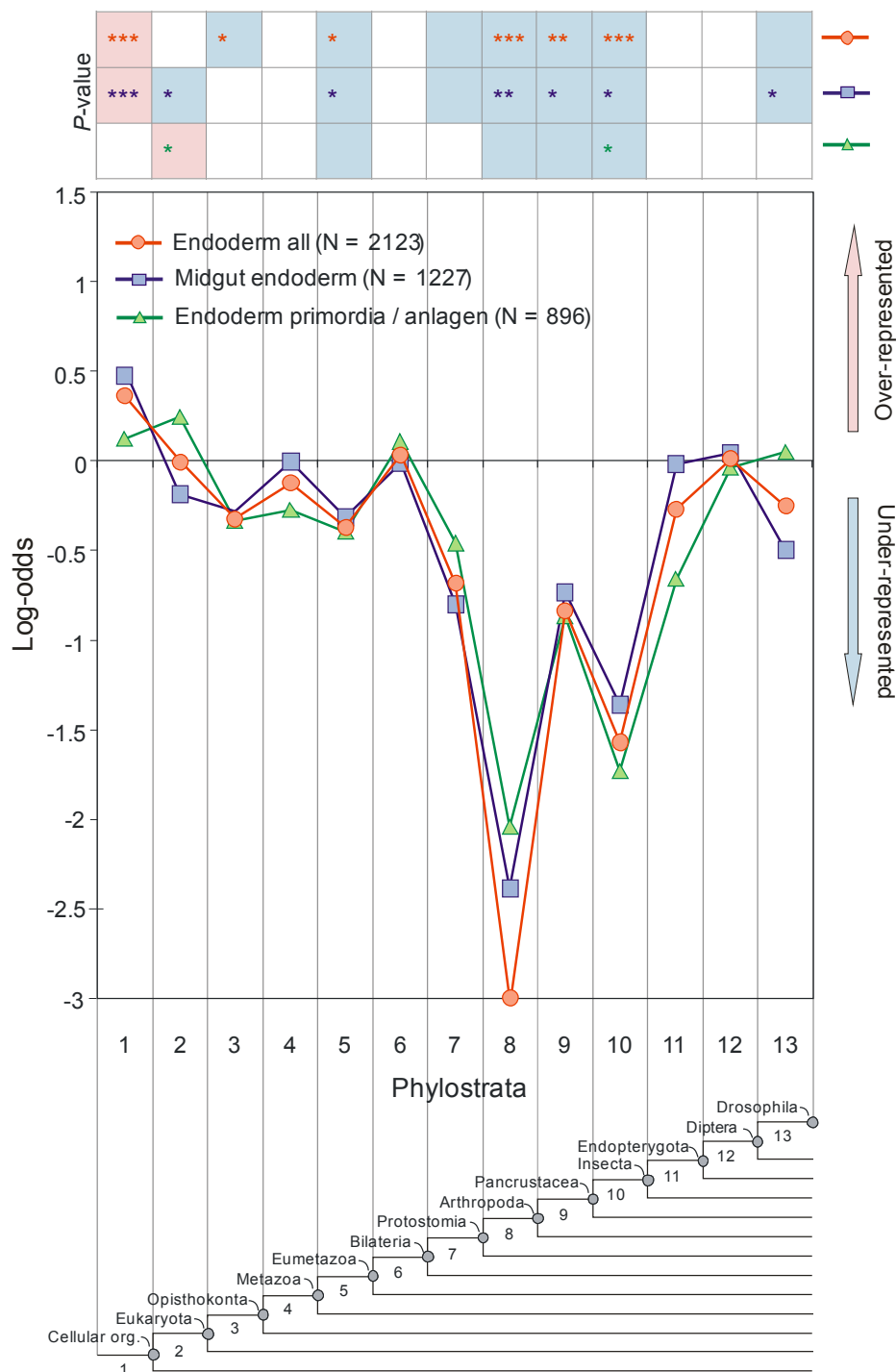


Slika 4. Statistička analiza ekspresija ektoderma i organskih sustava ektodermalnog porijekla na filostratigrafskoj mapi genoma *Drosophila melanogaster*. Trinaest filostratuma koji odgovaraju filogenetskim međuvorovima (internodijima – niže na prikazu) obrubljeni su vertikalnim linijama i označavaju skupine gena koji vuku svoje porijeklo iz odgovarajućih evolucijskih perioda. U svakom filostratumu se učestalost (frekvencija) ekspresijskih domena u anatomskim strukturama nastalih od ektoderma (crveno), trahealnog sustava (plavo), epiderma (zeleno), probavila (crno) i živčanog sustava (sivo) uspoređuje s učestalošću cijelog uzorka, a devijacije su prikazane pomoću log-odds (y-os). Log-odds vrijednosti nula znači da se frekvencije ekspresija u filostratumu i u cijelom uzorku ne razlikuju, dok pozitivne i negativne vrijednosti upućuju na veću ili manju zastupljenost od očekivanja. Značajnost devijacija prikazana je u tablici s P-vrijednostima (gornji dio prikaza; *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001; dvosmjerni hipergeometrijski test s FDR-korekcijom za višestruko testiranje prema broju filostratuma). Značajna su odstupanja u gornjem panelu označena blijedocrvenom (pozitivna) ili svijetloplavom (negativna) bojom. Odstupanja koja su izgubila značajnost primjenom FDR-korekcija označena su obojenim poljima bez zvjezdica. U legendi iznad krivulja prikazani su odgovarajući ukupni brojevi ekspresija. Strelce u bojama koje odgovaraju krivuljama pokazuju najraniji pretpostavljeni nastanak pojedinih ektodermalnih sustava.

4.3. ENDODERM

Endoderm je u genomu vinske mušice predstavljen s ukupno 2123 genske ekspresije, kao što to prikazuje analiza na slici 5. Budući da se strukture endodermalnog sustava kod *Drosophila melanogaster* svode na strukture koje pripadaju srednjem dijelu probavila, filostratigrafska analiza endoderma svela se na usporedbu cjelokupnog uzorka ekspresija za endoderm s ekspresijama srednjeg dijela probavila i ekspresijama endodermalnih primordijalnih stanica.

Analiza je pokazala kako se sva tri skupa ekspresija na mapi ponašaju vrlo slično, na način da se jedino u filogenetski najstarijim FS (od pojave staničnih organizama u FS 1 do nastanka Eukaryota u FS 2) opažaju veće vrijednosti zastupljenosti ekspresija od očekivanih, dok je u mlađim FS (od pojave Opisthokonta u FS 3 do pojave *Drosophila* u FS 13) primjetan trend nastanka manjeg broja novih gena nego što bi to bilo za očekivati u odnosu na veličinu cijelog uzorka.

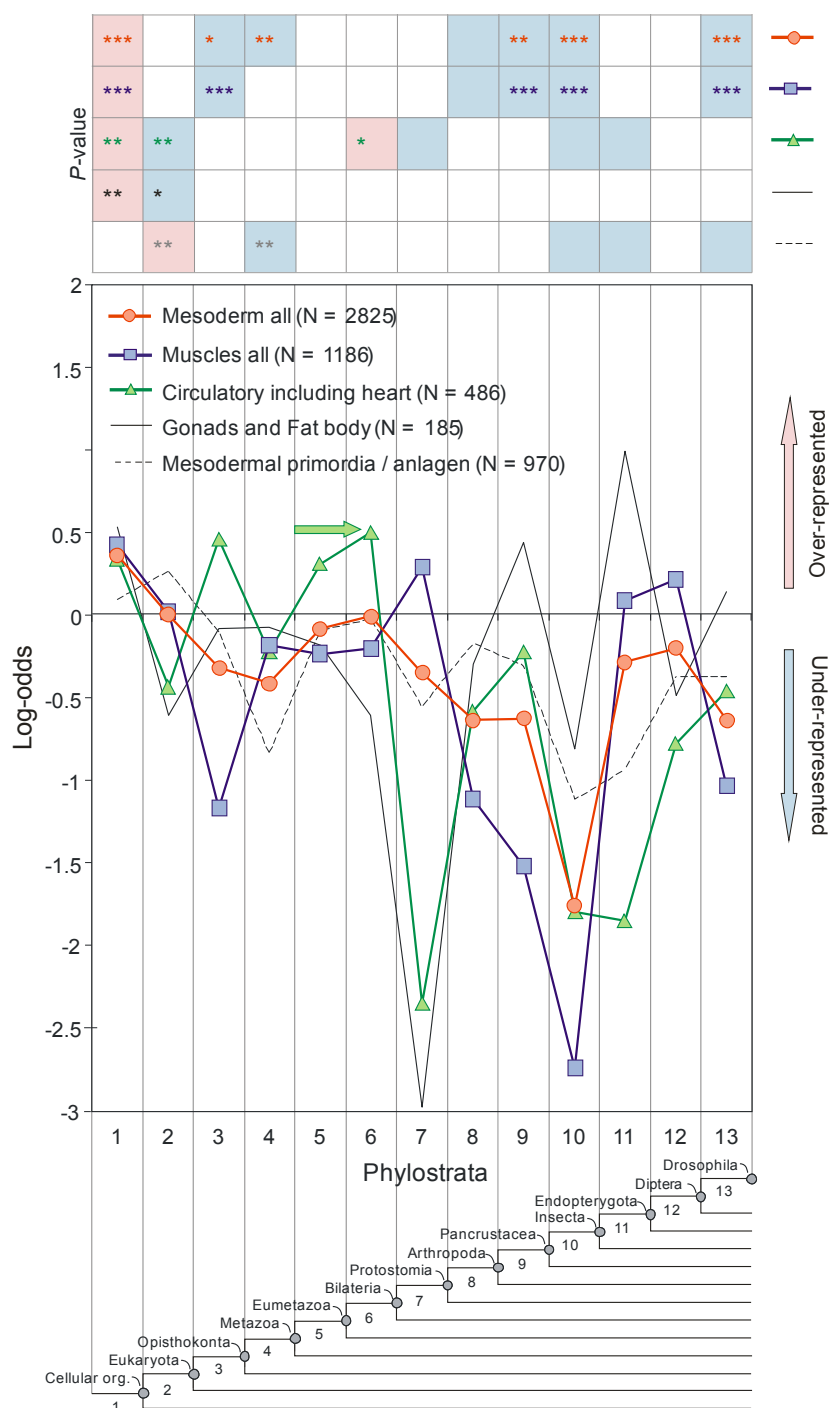


Slika 5. Statistička analiza ekspresija endoderma i organskih sustava endodermalnog porijekla na filostratigrafskoj mapi genoma *Drosophila melanogaster*. Trinaest filostratuma koji odgovaraju filogenetskim međuvorovima (internodijima – niže na prikazu) obrubljeni su vertikalnim linijama i označavaju skupine gena koji vuku svoje porijeklo iz odgovarajućih evolucijskih perioda. U svakom filostratumu se učestalost (frekvencija) ekspresijskih domena u anatomskim strukturama koje pripadaju endodermu (crveno), srednjem dijelu probavila (plavo) i endodermalnim primordijalnim tkivima (zeleno) uspoređuje s učestalošću cijelog uzorka, a devijacije su prikazane pomoću log-odds (y-os). Log-odds vrijednosti nula znači da se frekvencije ekspresija u filostratumu i u cijelom uzorku ne razlikuju, dok pozitivne i negativne vrijednosti upućuju na veću ili manju zastupljenost od očekivanja. Značajnost devijacija prikazana je u tablici s P-vrijednostima (gornji dio prikaza; *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001; dvosmjerni hipergeometrijski test s FDR-korekcijom za višestruko testiranje prema broju filostratuma). Značajna su odstupanja u gornjem panelu označena blijedocrvenom (pozitivna) ili svijetloplavom (negativna) bojom. Odstupanja koja su izgubila značajnost primjenom FDR-korekcija označena su obojenim poljima bez zvjezdica. U legendi iznad krivulja prikazani su odgovarajući ukupni brojevi ekspresija.

4.4. MEZODERM

Mezoderm je u genomu vinske mušice predstavljen s ukupno 2825 genskih ekspresija, kao što to prikazuje analiza na slici 6. Mezodermalnog su porijekla mišići, što uključuje i mišiće probavila, optjecajni sustav, uključujući i dorzalnu žilu („srce“), te reproduktivni sustav i masno tijelo. U analizu su, osim ovih sustava, uključene i ekspresije primordijalnih stanica mezoderma.

Organski sustavi mezodermalnog porijekla velikim dijelom prate na filostratigrafskoj analizi trendove za cjelokupni mezoderm. Tako se u mlađim FS (od pojave Opisthokonta u FS 3 sve do danas) većinom opažaju učestalosti ekspresija manje od očekivanih vrijednosti. Jedina je iznimka značajno veća učestalost ekspresija od očekivane za optjecajni sustav u FS 6, koji odgovara pretku bilateralno simetričnih životinja. Detaljnije su pojedini organski sustavi mezoderma analizirani u daljnjem tekstu (vidjeti poglavlja 4.8., 4.9. i 4.10.).



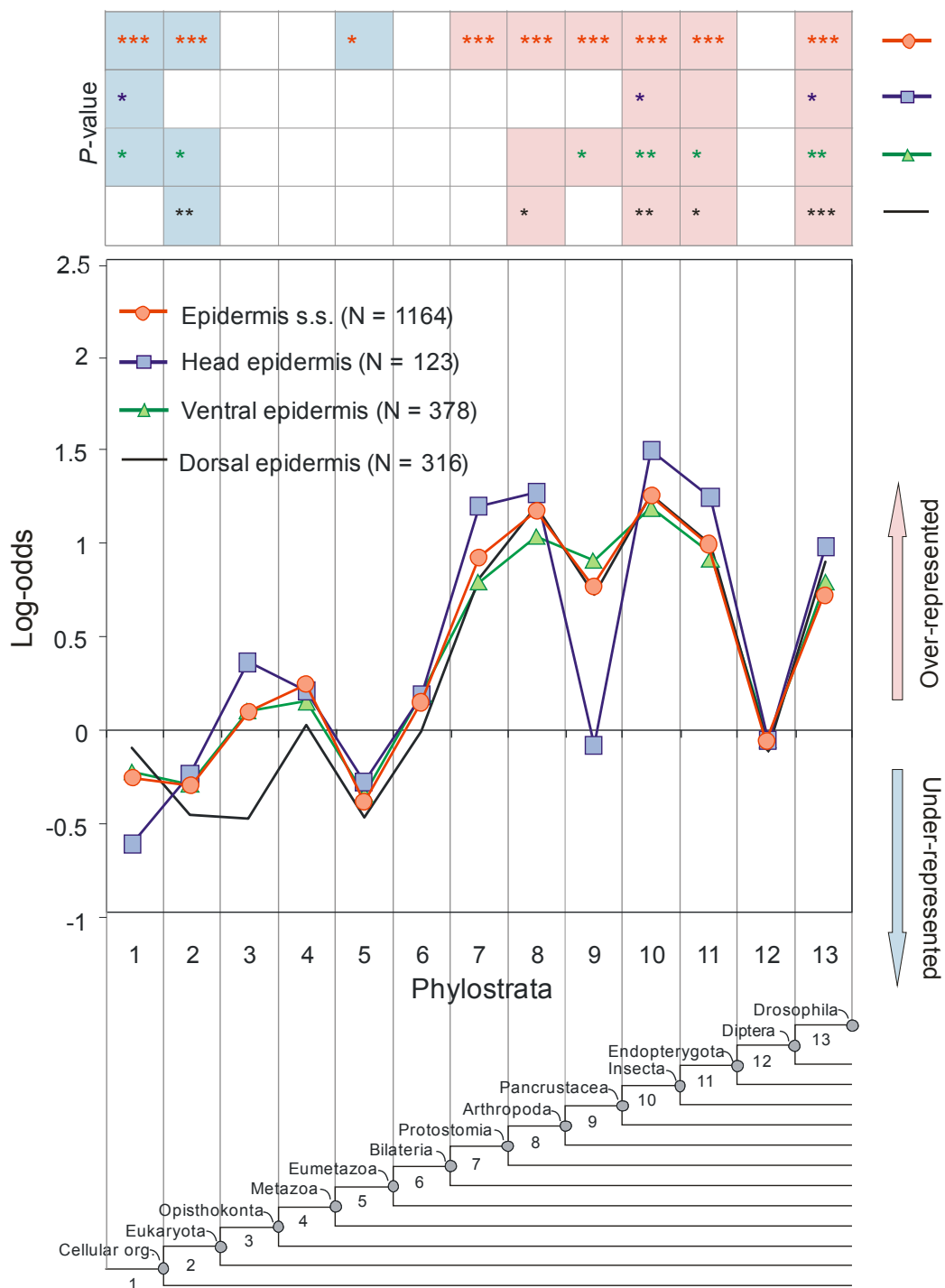
Slika 6. Statistička analiza ekspresija mezoderma i organskih sustava mezodermalnog porijekla na filostratigrafskoj mapi genoma *Drosophila melanogaster*. Trinaest filostratuma koji odgovaraju filogenetskim međučvorovima (internodijima – niže na prikazu) obrubljeni su vertikalnim linijama i označavaju skupine gena koji vuku svoje porijeklo iz odgovarajućih evolucijskih perioda. U svakom filostratumu se učestalost (frekvencija) ekspresijskih domena u anatomskim strukturama koje pripadaju mezodermu (crveno), mišićima (plavo), optjecajnom sustavu (zeleno), reproduktivnom sustavu (crno) i mezodermalnim primordijalnim tkivima (crno iscrtkano) uspoređuje s učestalošću cijelog uzorka, a devijacije su prikazane pomoću log-odds (y-os). Log-odds vrijednosti nula znači da se frekvencije ekspresija u filostratumu i u cijelom uzorku ne razlikuju, dok pozitivne i negativne vrijednosti upućuju na veću ili manju zastupljenost od očekivanja. Značajnost devijacija prikazana je u tablici s P-vrijednostima (gornji dio prikaza; *P < 0,05; **P < 0,01, ***P < 0,001; dvosmjerni hipergeometrijski test s FDR-korekcijom za višestruko testiranje prema broju filostratuma). Značajna su odstupanja u gornjem panelu označena blijedocrvenom (pozitivna) ili svijetloplavom (negativna) bojom. Odstupanja koja su izgubila značajnost primjenom FDR-korekcija označena su obojenim poljima bez zvjezdica. U legendi iznad krivulja prikazani su odgovarajući ukupni brojevi ekspresija. Zelenom strelicom je označena moguća najranija pojava srca u okviru optjecajnog sustava.

4.5. EPIDERMALNI SUSTAV (EPIDERM)

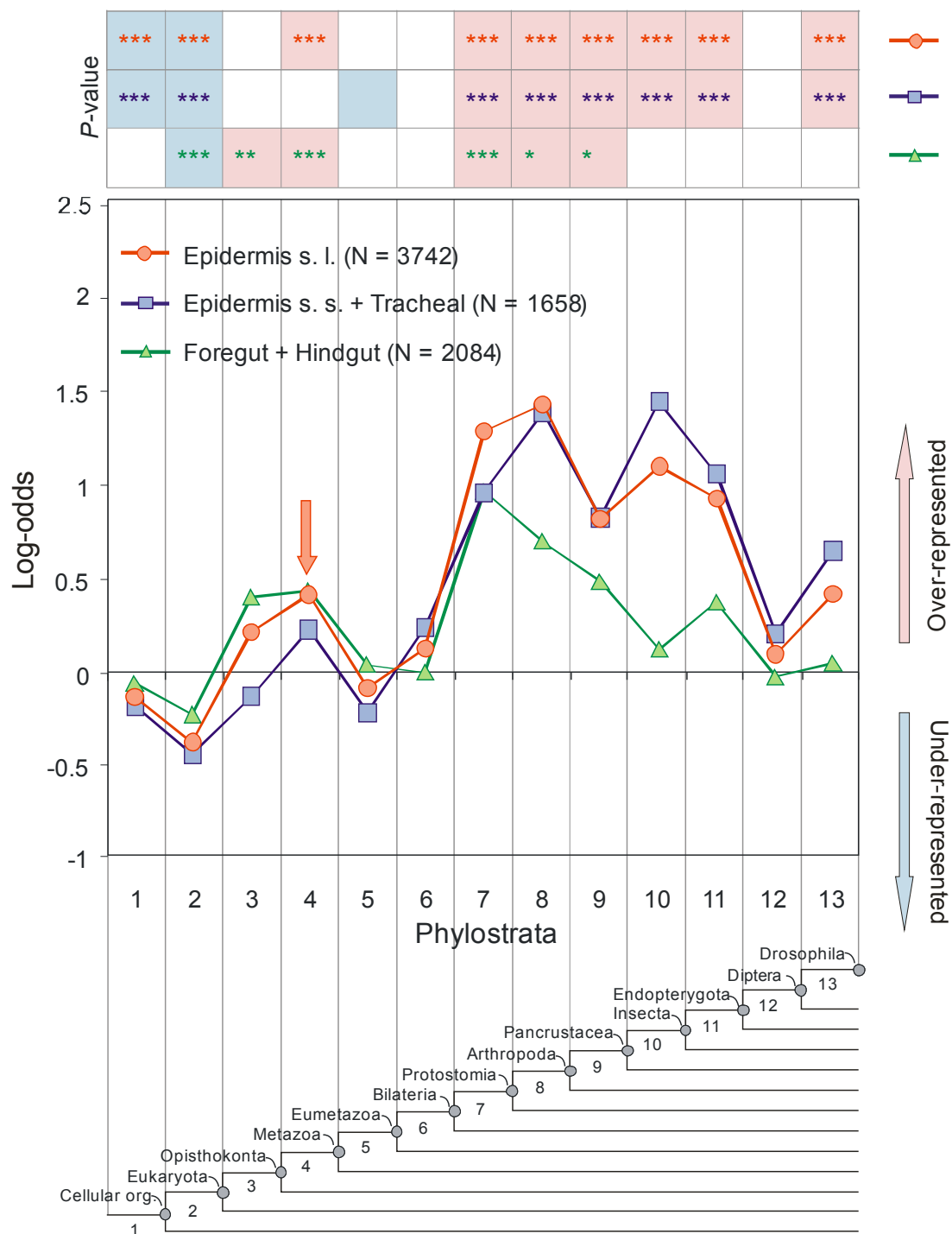
Filostratigrafska analiza anatomskih struktura epidermalnog sustava vinske mušice je inicijalno napravljena na relativno usko definiranom uzorku od 1164 genskih ekspresija. Tako u prvotnu analizu epiderma nisu uključene strukture poput uzdušnica (koje su obrađene u okviru trahealnog sustava) ili proksimalnih i distalnih dijelova probavila (koji su obrađeni u okviru probavnog sustava), iako bi strogo gledano i ove strukture pripadale epidermalnom sustavu, jer su prekrivene hitinskom kutikulom i u osnovi predstavljaju uvrate vanjske stijenke tijela. U toj je analizi epiderm podijeljen na dorzalni, ventralni i epiderm glave (slika 7).

Općenito se iz analize može zaključiti kako se komponente epiderma ponašaju slično kao i cijeli epidermalni skup ekspresija. Tako su pozitivna odstupanja od očekivanih vrijednosti sa statističkom značajnošću koncentrirana na mlađe FS (od pojave *Protostomia* u FS 7 do pojave *Endopterygota* u FS 11, te kod pojave *Drosophila* u FS 13), što ukazuje da je velik broj novih gena ili njihovih novih ekspresija konstantno ulazio u genom vinske mušice od odvajanja njezine razvojne linije od deuterostomičnih životinja do pojave kukaca s potpunom preobrazbom, te ponovno kod pojave roda *Drosophila*. Odstupanja od tog trenda mogla bi se pripisati relativno malenom broju genskih ekspresija u analiziranom uzorku.

Kod nastanka Metazoa (FS 4) također su vidljiva odstupanja učestalosti ekspresija viša od očekivanja, no signal nije dovoljnog intenziteta da bi pokazivao statističku značajnost. Međutim, ako epiderm definiramo tako da u njegov skup ekspresija uključimo i traheje i dio probavila obavijen kutikulom (slika 8, zelena krivulja), njihovim doprinosom i signal u FS 4 postaje značajan (slika 8, crvena krivulja). Ovakav rezultat potvrđuje nastanak epiderma kod pretka prvih životinja.



Slika 7. Statistička analiza epidermalnog sustava u užem smislu (*sensu stricto*, s.s.) na filostratigrafskoj mapi genoma vinske mušice (*Drosophila melanogaster*). Trinaest filostratuma koji odgovaraju filogenetskim međučvorovima (internodijima – niže na prikazu) obrubljeni su vertikalnim linijama i označavaju skupine gena koji vuku svoje porijeklo iz odgovarajućih evolucijskih perioda. U svakom filostratumu se učestalost (frekvencija) ekspresijskih domena u anatomskim strukturama koje pripadaju cijelom epidermu (s.s.) (crveno), epidermu glave (plavo), ventralnom epidermu (zeleno) i dorzalnom epidermu (crno) uspoređuje s učestalošću cijelog uzorka, a devijacije su prikazane pomoću log-odds (y-os). Log-odds vrijednosti nula znači da se frekvencije ekspresija u filostratumu i u cijelom uzorku ne razlikuju, dok pozitivne i negativne vrijednosti upućuju na veću ili manju zastupljenost od očekivanja. Značajnost devijacija prikazana je u tablici s P-vrijednostima (gornji dio prikaza; *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001; dvosmjerni hipergeometrijski test s FDR-korekcijom za višestruko testiranje prema broju filostratuma). Značajna su odstupanja u gornjem panelu označena blijedocrvenom (pozitivna) ili svijetloplavom (negativna) bojom. Odstupanja koja su izgubila značajnost primjenom FDR-korekcija označena su obojenim poljima bez zvjezdica. U legendi iznad krivulja prikazani su odgovarajući ukupni brojevi ekspresija.

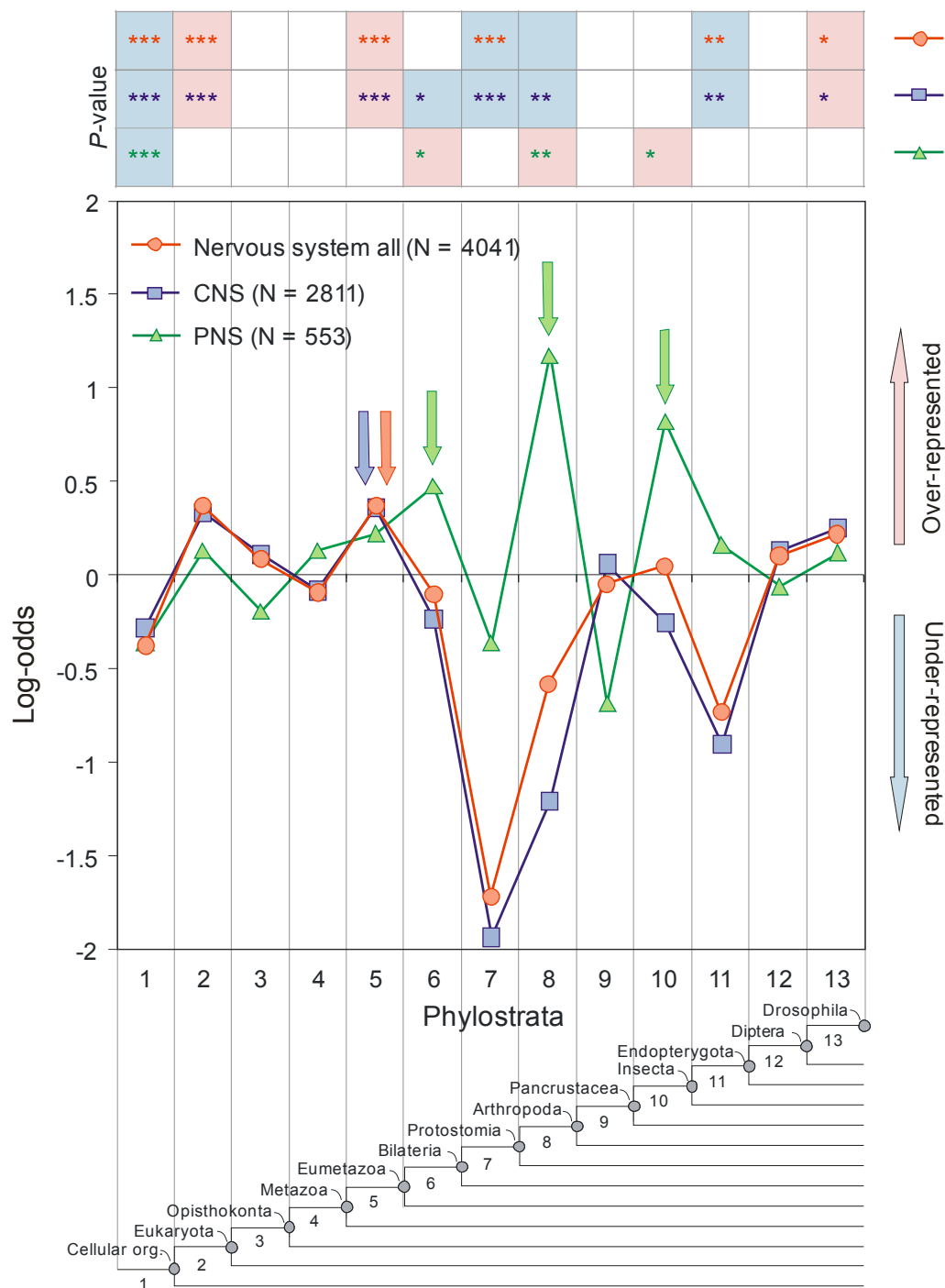


Slika 7. Statistička analiza epidermalnog sustava u širem smislu (*sensu lato*, s.l.) na filostratigrafskoj mapi *Drosophila melanogaster*. Trinaest filostratuma koji odgovaraju filogenetskim međučvorovima (internodijima – niže na prikazu) obrubljeni su vertikalnim linijama i označavaju skupine gena koji vuku svoje porijeklo iz odgovarajućih evolucijskih perioda. U svakom filostratumu se učestalost (frekvencija) ekspresijskih domena u anatomskim strukturama koje pripadaju cijelom epidermu (s.l.) (crveno), epidermu (s.s.) i trahealnom dijelu (plavo) i probavnom dijelu (zeleno) uspoređuje s učestalošću cijelog uzorka, a devijacije su prikazane pomoću log-odds (y-os). Log-odds vrijednosti nula znači da se frekvencije ekspresija u filostratumu i u cijelom uzorku ne razlikuju, dok pozitivne i negativne vrijednosti upućuju na veću ili manju zastupljenost od očekivanja. Značajnost devijacija prikazana je u tablici s P-vrijednostima (gornji dio prikaza; *P < 0,05; **P < 0,01, ***P < 0,001; dvosmjerni hipergeometrijski test s FDR-korekcijom za višestruko testiranje prema broju filostratuma). Značajna su odstupanja u gornjem panelu označena blijedocrvenom (pozitivna) ili svijetloplavom (negativna) bojom. Odstupanja koja su izgubila značajnost primjenom FDR-korekcija označena su obojenim poljima bez zvjezdica. U legendi iznad krivulja prikazani su odgovarajući ukupni brojevi ekspresija. Crvena strelica ukazuje na nastanak epiderma.

4.6. ŽIVČANI SUSTAV

Na filostratigrafskoj mapi vinske mušice živčani sustav određen je s ukupno 4041 genskom ekspresijom. U analizi je skup ekspresija živčanog sustava podijeljen na središnji živčani sustav (CNS) i periferni dio živčanog sustava (PNS). Rezultati analize su zanimljivi u nekoliko točaka (slika 9).

Tako se cjelokupni set ekspresija živčanog sustava javlja sa statistički značajnim pozitivnim odstupanjem u vrijeme nastanka Eumetazoa (FS 5), koji su najvjerojatnije bili prve životinje sa živčanim sustavima. Nalaz značajno većeg odstupanja od očekivane vrijednosti u FS 5 i kod skupa ekspresija za CNS ukazuje da je velik broj gena važnih za koordinaciju funkcija živčanog sustava ušao u genom vinske mušice već kod pretka Eumetazoa. Također su zanimljivi nalazi za PNS, gdje su neočekivano visoka odstupanja zabilježena u FS 6 (LCA Bilateria), 8 (LCA Arthropoda) i 10 (LCA Insecta). Kod Bilateria se zbog aktivnog usmjerenog kretanja i anteriorno-posteriorne organizacije tijela javlja potreba za osjetilima i perifernim živcima, dok bi poseban oblik gradivnog nacrtu tijela Arthropoda, kao i osjetilne specijalizacije kod Insecta imali za očekivati i značajne adaptivne događaje u evoluciji PNS-a u odgovarajućim razdobljima evolucije.



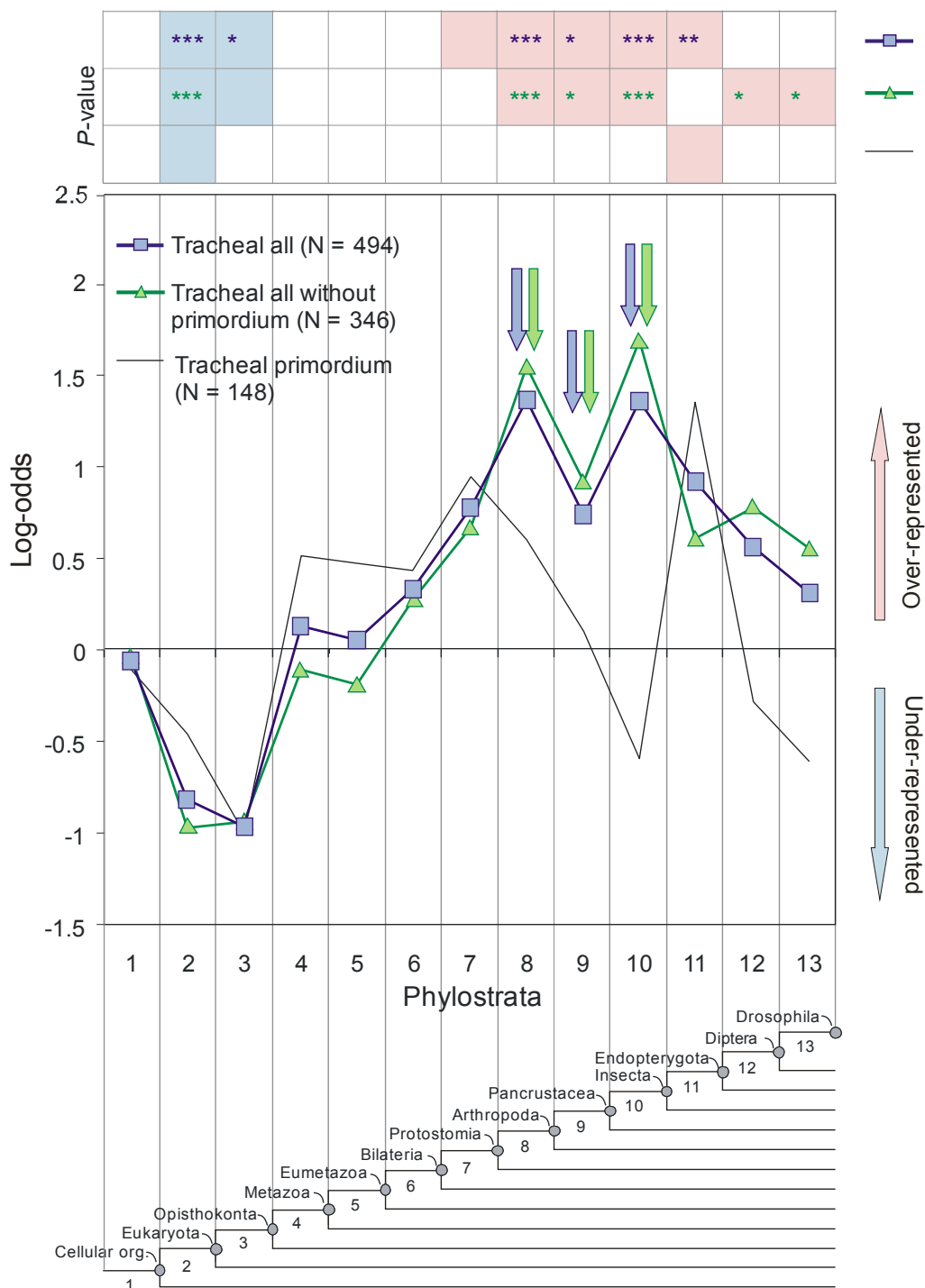
Slika 9. Statistička analiza središnjeg i perifernog živčanog sustava, te svih ekspresija za živčani sustav na mapi genoma *Drosophila melanogaster*. Trinaest filostratuma koji odgovaraju filogenetskim međučvorovima (internodijima – niže na prikazu) obrubljeni su vertikalnim linijama i označavaju skupine gena koji vuku svoje porijeklo iz odgovarajućih evolucijskih perioda. U svakom filostratumu se učestalost (frekvencija) ekspresijskih domena u anatomske strukture koje pripadaju cjelokupnom živčanom sustavu (crveno), CNS-u (plavo) i PNS-u (zeleno) uspoređuje s učestalošću cijelog uzorka, a devijacije su prikazane pomoću log-odds vrijednosti nula znači da se frekvencije ekspresija u filostratumu i u cijelom uzorku ne razlikuju, dok pozitivne i negativne vrijednosti upućuju na veću ili manju zastupljenost od očekivanja. Značajnost devijacija prikazana je u tablici s P-vrijednostima (gornji dio prikaza; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; dvosmjerni hipergeometrijski test s FDR-korekcijom za višestruko testiranje prema broju filostratuma). Značajna su odstupanja u gornjem panelu označena blijedocrvenom (pozitivna) ili svijetloplavom (negativna) bojom. Odstupanja koja su izgubila značajnost primjenom FDR-korekcija označena su obojenim poljima bez zvjezdica. U legendi iznad krivulja prikazani su odgovarajući ukupni brojevi ekspresija. Plava i crvena strelica ukazuju na evolucijski nastanak živčanog sustava i ranog oblika CNS-a, dok zelene strelice označavaju važne adaptivne događaje u evoluciji PNS-a (vidjeti tekst).

4.7. RESPIRATORNI (TRAHEALNI) SUSTAV

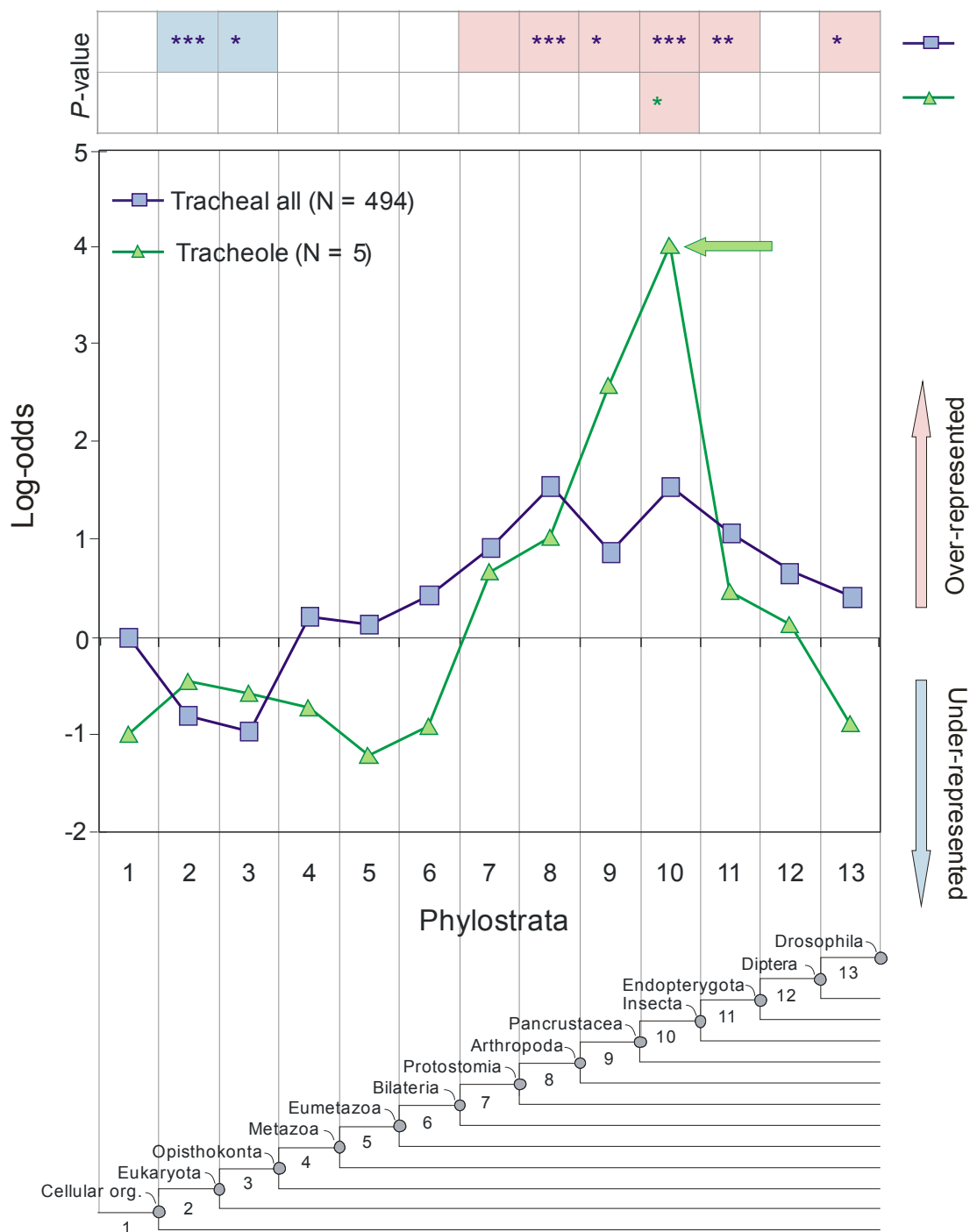
Anatomske strukture koje pripadaju trahealnom sustavu unutar filostratigrafske mape *Drosophila* određene su s ukupno 494 ekspresije (slika 10). Trahealni sustav je analiziran na dva načina, s uključenim primordijalnim stanicama i bez njih, a analizirane su i primordijalne stanice same. Posebno su napravljene i analize različitih dijelova trahealnog sustava, od čega je odabrana za prikaz analiza traheola (slika 11), koje predstavljaju najfinije ogranke trahealnog sustava.

U analizi je u mlađim filostratumima primjetan trend većih zastupljenosti ekspresija od očekivanih, te se može primijetiti kako ovaj uzorak prate na oba načina prezentirani skupovi ekspresija trahealnoga sustava (i sa i bez uključenih primordijalnih stanica / tkiva). Statistički značajna odstupanja prvi se put u evoluciji javljaju kod pretka Arthropoda (FS 8), što upućuje na mogućnost da su se već tada javile neke preadaptacije u smjeru nastanka ovakvog sustava. U FS 9 (LCA Pancrustacea) također opažamo značajno pozitivno odstupanje. Traheje se opažaju, osim kod Insecta, i kod Onychophora, Myriapoda i dijela Chelicerata (Araneae), što je u skladu s opažanjem da i bazalno od Insecta na filostratigrafskoj analizi imamo statistički značajna pozitivna odstupanja za trahealni sustav.

Elaboracija trahealnog sustava se, kako pokazuju visoke vrijednosti odstupanja i za FS 10, nastavlja visokim intenzitetom i kod Insecta. Dobar primjer ovakve elaboracije su traheole, koje dovode kisik sve do samih stanica. Među člankonošcima jedino kukci imaju ekstenzivno razvijen traheolarni sustav, tako da bismo u analizi traheola očekivali da se u FS 10 (LCA Insecta) dogodio neki važni adaptivni događaj. Rezultati, kao što je vidljivo na slici 11, potvrđuju takve sumnje. Ovdje treba naglasiti kako je set genskih ekspresija za traheole bio iznimno malen, tako da nismo u mogućnosti govoriti o pouzdanosti. Međutim, trend je u svakom slučaju indikativan.



Slika 10. – Statistička analiza ekspresije trahealnog sustava na filostratigrafskoj mapi. Trinaest filostratuma koji odgovaraju filogenetskim međučvorovima (internodijima – niže na prikazu) obrubljeni su vertikalnim linijama i označavaju skupine gena koji vuku svoje porijeklo iz odgovarajućih evolucijskih perioda. U svakom filostratumu se učestalost (frekvencija) ekspresijskih domena u anatomskim strukturama koje pripadaju cjelokupnom trahealnom sustavu (plavo), trahealnom sustavu bez primordijalnih tkiva (zeleno) i primordijalnim tkivima (cmo) uspoređuje s učestalošću cijelog uzorka, a devijacije su prikazane pomoću log-odds (y-os). Log-odds vrijednosti nula znači da se frekvencije ekspresija u filostratumu i u cijelom uzorku ne razlikuju, dok pozitivne i negativne vrijednosti upućuju na veću ili manju zastupljenost od očekivanja. Značajnost devijacija prikazana je u tablici s P-vrijednostima (gornji dio prikaza; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; dvosmjerni hipergeometrijski test s FDR-korekcijom za višestruko testiranje prema broju filostratuma). Značajna su odstupanja u gornjem panelu označena blijedocrvenom (pozitivna) ili svijetloplavom (negativna) bojom. Odstupanja koja su izgubila značajnost primjenom FDR-korekcija označena su obojenim poljima bez zvjezdica. U legendi iznad krivulja prikazani su odgovarajući ukupni brojevi ekspresija. Plave i zelene strelice obilježavaju točke bitne za evoluciju sustava.



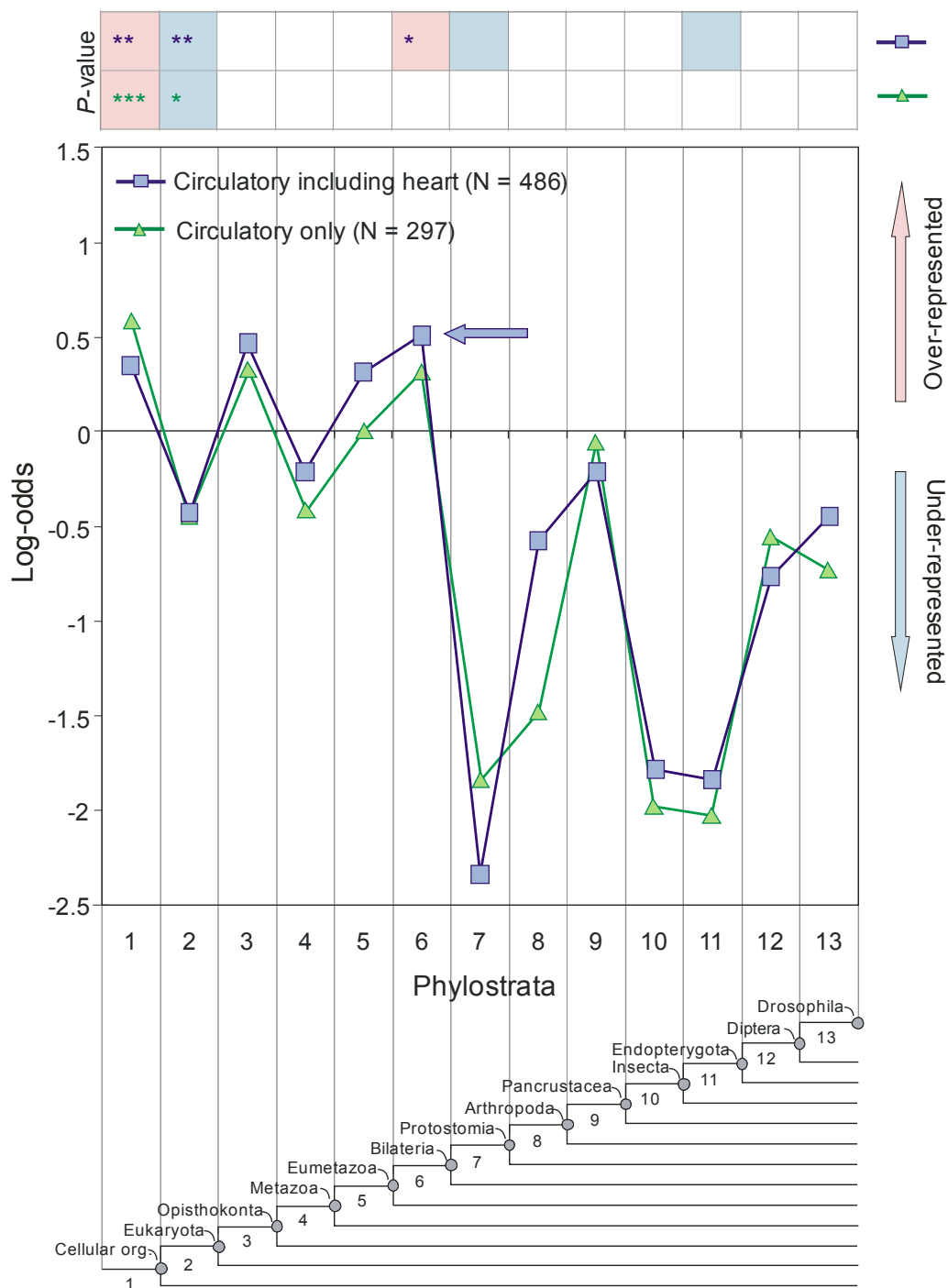
Slika 11. - Statistička analiza ekspresije traheola u odnosu na cjelokupni trahealni sustav na filostratigrafskoj mapi. Trinaest filostratuma koji odgovaraju filogenetskim međuvorovima (internodijima – niže na prikazu) obrubljeni su vertikalnim linijama i označavaju skupine gena koji vuku svoje porijeklo iz odgovarajućih evolucijskih perioda. U svakom filostratumu se učestalost (frekvencija) ekspresijskih domena u anatomskim strukturama koje pripadaju cjelokupnom trahealnom sustavu (plavo) i traheolama (zeleno) uspoređuje s učestalošću cijelog uzorka, a devijacije su prikazane pomoću log-odds (y-os). Log-odds vrijednosti nula znači da se frekvencije ekspresija u filostratumu i u cijelom uzorku ne razlikuju, dok pozitivne i negativne vrijednosti upućuju na veću ili manju zastupljenost od očekivanja. Značajnost devijacija prikazana je u tablici s P-vrijednostima (gornji dio prikaza; *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001; dvosmjerni hipergeometrijski test s FDR-korekcijom za višestruko testiranje prema broju filostratuma). Značajna su odstupanja u gornjem panelu označena blijedocrvenom (pozitivna) ili svijetloplavom (negativna) bojom. Odstupanja koja su izgubila značajnost primjenom FDR-korekcija označena su obojenim poljima bez zvjezdica. U legendi iznad krivulja prikazani su odgovarajući ukupni brojevi ekspresija. Zelena strelica ukazuje na evolucijsku pojavu traheola (LCA Insecta).

4.8. CIRKULATORNI (OPTJECAJNI) SUSTAV

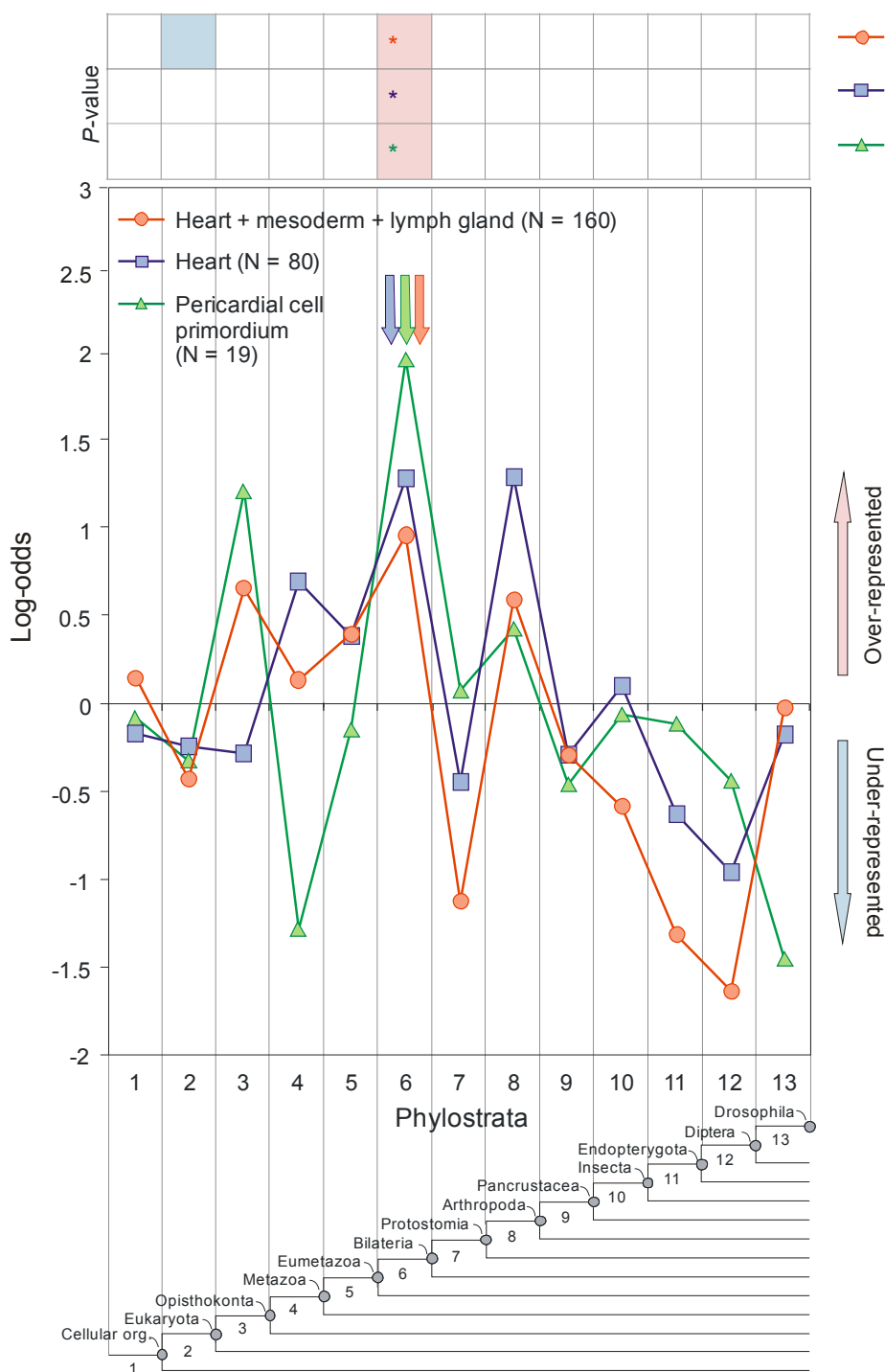
Optjecajni sustav unutar filostratigrafske mape *Drosophila* genoma čine anatomske strukture određene s ukupno 486 genskih ekspresija. Napravljene su analize skupa ekspresija za optjecajni sustav sa i bez uključenih ekspresija za „srce“ (slika 12), a „srce“ je analizirano i zasebno, ovisno o načinu kako ga kod vinske mušice definiramo (slika 13).

Iz analize je vidljivo kako u većini FS zastupljenost ekspresija optjecajnoga sustava prati trendove za cjelokupni mezoderm (slika 6), na način da se većina esencijalnih genskih ekspresija javlja već pojavom prvih staničnih organizama (FS 1), dok se u od pojave Protostomia do pojave *Drosophila* (FS 7 – 13) u okviru sustava javlja relativno malen broj novih genskih ekspresija. Poseban slučaj predstavlja LCA Bilateria (FS 6), gdje u analizi optjecajnog sustava s uključenim srcem opažamo statistički značajno odstupanje u zastupljenosti ekspresija u pozitivnom dijelu krivulje. Ovo opažanje u kombinaciji s analizom sustava bez srca (gdje u FS 6 nema ovakvog odstupanja) ukazuje na važnost ekspresija srca.

“Srce” kod vinske mušice se sastoji od dorzalne pulsirajuće žile s pomoćnim tkivima, pa ga je moguće definirati uže ili šire. Međutim, neovisno o veličini uzorka ekspresija, kod srca se javljaju slični rezultati. Na slici 13 vidljivo je da se kod sve tri definicije srca javlja značajno odstupanje u FS 6 (LCA Bilateria), što ukazuje da je u genom vinske mušice u tom razdoblju evolucije ušao relativno velik broj novih gena i da se tu, vezano za srce, vjerojatno dogodila neka važna adaptacija.



Slika 12. – Statistička analiza ekspresije optjecajnog sustava na filostratigrafskoj mapi. Trinaest filostratuma koji odgovaraju filogenetskim međuvorovima (internodijima – niže na prikazu) obrubljeni su vertikalnim linijama i označavaju skupine gena koji vuku svoje porijeklo iz odgovarajućih evolucijskih perioda. U svakom filostratumu se učestalost (frekvencija) ekspresijskih domena u anatomskim strukturama koje pripadaju optjecajnom sustavu s uključenim srcem (plavo) i bez uključenog srca (zeleno) uspoređuje s učestalošću cijelog uzorka, a devijacije su prikazane pomoću log-odds (y-os). Log-odds vrijednosti nula znači da se frekvencije ekspresija u filostratumu i u cijelom uzorku ne razlikuju, dok pozitivne i negativne vrijednosti upućuju na veću ili manju zastupljenost od očekivanja. Značajnost devijacija prikazana je u tablici s P-vrijednostima (gornji dio prikaza; *P < 0,05; **P < 0,01, ***P < 0,001; dvosmjerni hipergeometrijski test s FDR-korekcijom za višestruko testiranje prema broju filostratuma). Značajna su odstupanja u gornjem panelu označena blijedocrvenom (pozitivna) ili svijetloplavom (negativna) bojom. Odstupanja koja su izgubila značajnost primjenom FDR-korekcija označena su obojenim poljima bez zvjezdica. U legendi iznad krivulja prikazani su odgovarajući ukupni brojevi ekspresija. Zelena strelica ukazuje kako su se ekspresije za srce pokazale ključnima za formiranje statistički značajnog odstupanja za optjecajni sustav u FS 6 (LCA Bilateria), zbog čega je srce naknadno analizirano zasebno (slika 12).

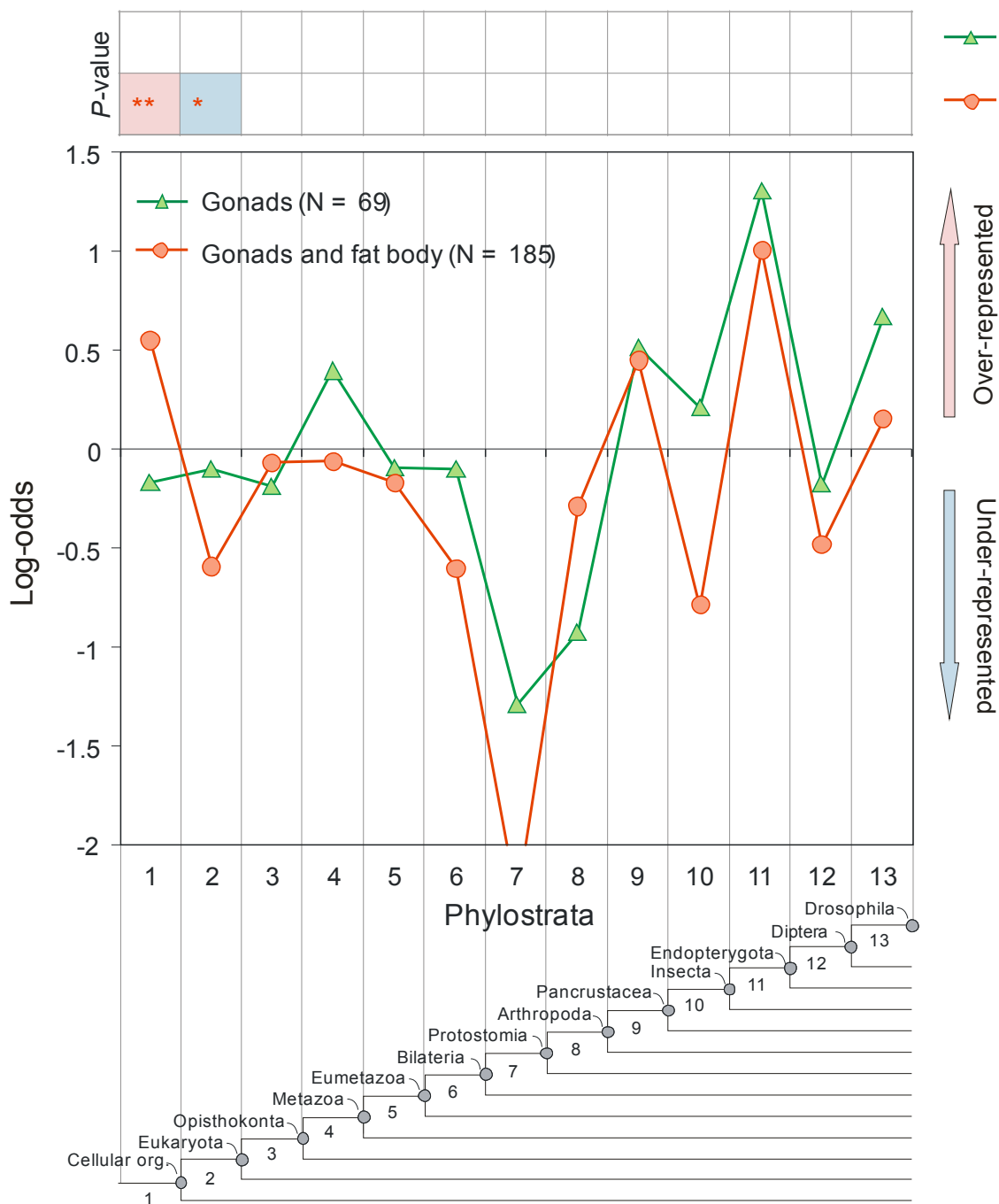


Slika 13. – Analiza ekspresijskih domena srca na filostratigrafskoj mapi genoma *Drosophila melanogaster*. Trinaest filostratuma koji odgovaraju filogenetskim međučvorovima (internodijima – niže na prikazu) obrubljeni su vertikalnim linijama i označavaju skupine gena koji vuku svoje porijeklo iz odgovarajućih evolucijskih perioda. U svakom filostratumu se učestalost (frekvencija) ekspresijskih domena u anatomskim strukturama koje pripadaju različito definiranom „srcu“ (crveno, plavo i zeleno) uspoređuje s učestalošću cijelog uzorka, a devijacije su prikazane pomoću log-odds (y-os). Log-odds vrijednosti nula znači da se frekvencije ekspresija u filostratumu i u cijelom uzorku ne razlikuju, dok pozitivne i negativne vrijednosti upućuju na veću ili manju zastupljenost od očekivanja. Značajnost devijacija prikazana je u tablici s P-vrijednostima (gornji dio prikaza; *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001; dvosmjerni hipergeometrijski test s FDR-korekcijom za višestruko testiranje prema broju filostratuma). Značajna su odstupanja u gornjem panelu označena blijedocrvenom (pozitivna) ili svijetloplavom (negativna) bojom. Odstupanja koja su izgubila značajnost primjenom FDR-korekcije označena su obojenim poljima bez zvjezdica. U legendi iznad krivulja prikazani su odgovarajući ukupni brojevi ekspresija. Plava, zelena i crvena strelica ukazuju na mogući nastanak nekog oblika „srca“ kod LCA Bilateria.

4.9. RASPLODNI (REPRODUKTIVNI) SUSTAV

Anatomske strukture koje ulaze u sastav reproduktivnog sustava predstavljene su na filostratigrafskoj mapi sa 69, odnosno 185 ekspresija, ovisno o tome uključimo li u analizu i masno tijelo, koje nastaje tijekom embrionalnog razvoja vinske mušice iz zajedničkih stanica kao i reproduktivni sustav (slika 14).

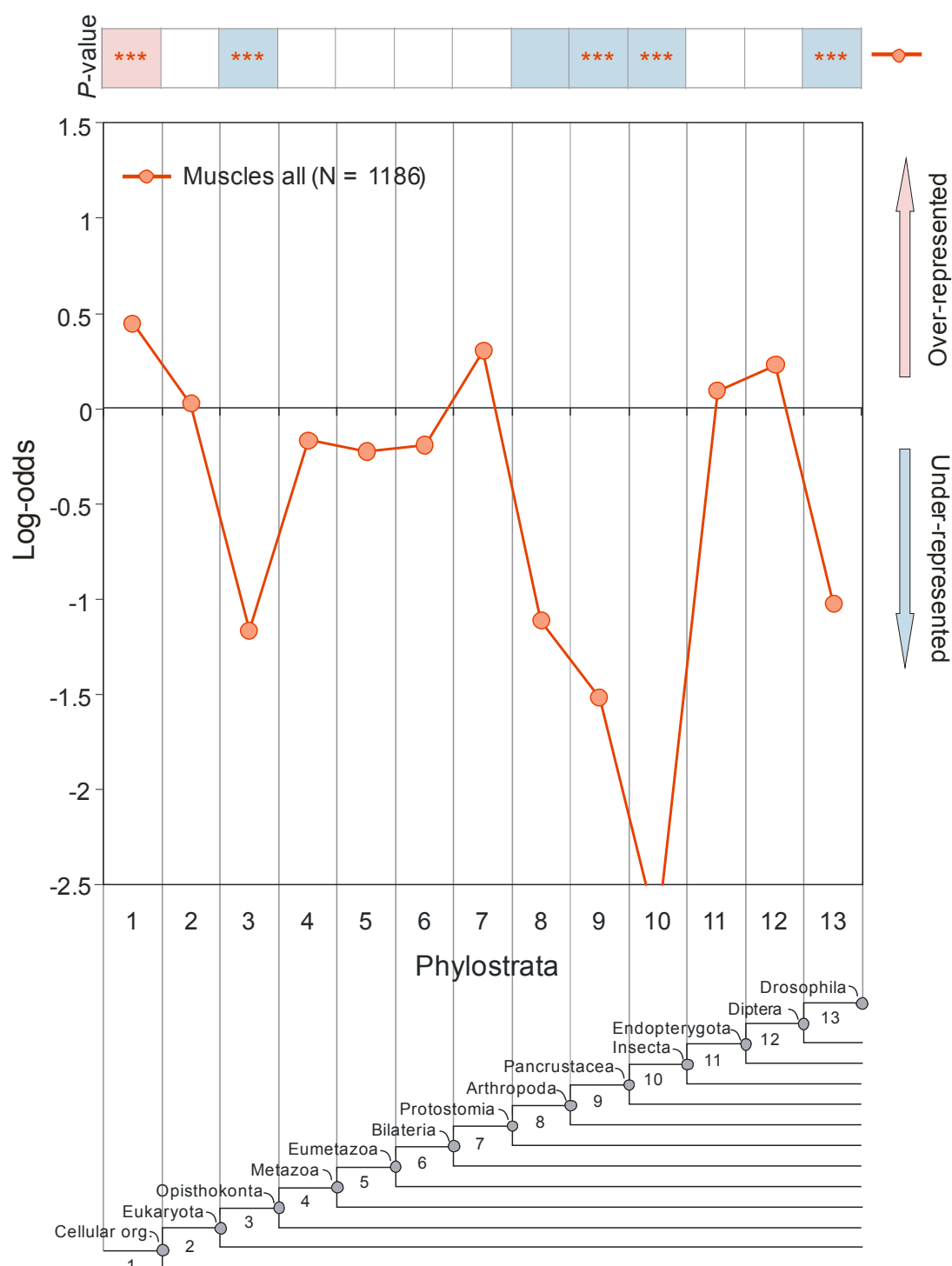
Analiza ovog sustava na filostratigrafskoj mapi vinske mušice nije pokazala mnogo zanimljivih rezultata, što je dijelom posljedica relativno male veličine uzorka, a dijelom i posljedica same prirode reproduktivnih sustava, jer su oni evolucijski vrlo plastični. Analiza užeg skupa ekspresija tako nije pokazala nikakva značajna odstupanja, dok je analiza šire definiranog sustava pokazala odstupanja samo u filogenetski najstarijim FS.



Slika 14. – Statistička analiza ekspresijskih domena reproduktivnog sustava na genomskoj filostratigrafskoj mapi *Drosophila melanogaster*. Trinaest filostratuma koji odgovaraju filogenetskim međučvorovima (internodijima – niže na prikazu) obrubljeni su vertikalnim linijama i označavaju skupine gena koji vuku svoje porijeklo iz odgovarajućih evolucijskih perioda. U svakom filostratumu se učestalost (frekvencija) ekspresijskih domena u anatomskim strukturama koje pripadaju gonadama (zeleno) i gonadama zajedno s masnim tijelom (crveno) uspoređuje s učestalošću cijelog uzorka, a devijacije su prikazane pomoću log-odds (y-os). Log-odds vrijednosti nula znači da se frekvencije ekspresija u filostratumu i u cijelom uzorku ne razlikuju, dok pozitivne i negativne vrijednosti upućuju na veću ili manju zastupljenost od očekivanja. Značajnost devijacija prikazana je u tablici s P-vrijednostima (gornji dio prikaza; *P < 0,05; **P < 0,01, ***P < 0,001; dvosmjerni hipergeometrijski test s FDR-korekcijom za višestruko testiranje prema broju filostratuma). Značajna su odstupanja u gornjem panelu označena blijedocrvenom (pozitivna) ili svijetloplavom (negativna) bojom. Odstupanja koja su izgubila značajnost primjenom FDR-korekcija označena su obojenim poljima bez zvjezdica. U legendi iznad krivulja prikazani su odgovarajući ukupni brojevi ekspresija.

4.10. MIŠIĆNI (MUSKULATORNI) SUSTAV

Mišićni sustav u genomu vinske mušice predstavljen je anatomskim strukturama koje su bile određene s ukupno 1186 genskih ekspresija, što je prikazano na krivulji na slici 15. Analiza mišićnog sustava na filostratigrafskoj mapi genoma *Drosophila melanogaster* pokazala je da je većina najvažnijih gena koji ga određuju bila prisutna u genomu već kod prvih staničnih organizama (FS 1). Kasnije je tijekom evolucije u genom ulazio relativno malen broj novih gena, što odražava frekvencija ekspresija uglavnom manja od očekivanja. Osim u FS 1, frekvencije ekspresija veće od očekivanih javljaju se u FS 7 (LCA Protostomia), FS 11 (LCA Endopterygota) i FS 12 (LCA Diptera), međutim bez statističke značajnosti.



Slika 15. Statistička analiza ekspresije mišićnog sustava na filostratigrafskoj mapi *Drosophila melanogaster*. Trinaest filostratuma koji odgovaraju filogenetskim međučvorovima (internodijima – niže na prikazu) obrubljeni su vertikalnim linijama i označavaju skupine gena koji vuku svoje porijeklo iz odgovarajućih evolucijskih perioda. U svakom filostratumu se učestalost (frekvencija) ekspresijskih domena u anatomskim strukturama koje pripadaju mišićnom sustavu uspoređuje s učestalošću cijelog uzorka, a devijacije su prikazane pomoću log-odds (y-os). Log-odds vrijednosti nula znači da se frekvencije ekspresija u filostratumu i u cijelom uzorku ne razlikuju, dok pozitivne i negativne vrijednosti upućuju na veću ili manju zastupljenost od očekivanja. Značajnost devijacija prikazana je u tablici s P-vrijednostima (gornji dio prikaza; *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001; dvosmjerni hipergeometrijski test s FDR-korekcijom za višestruko testiranje prema broju filostratuma). Značajna su odstupanja u gornjem panelu označena blijedocrvenom (pozitivna) ili svijetloplavom (negativna) bojom. Odstupanja koja su izgubila značajnost primjenom FDR-korekcija označena su obojenim poljima bez zvjezdica. U legendi iznad krivulje je ukupni broj ekspresija.

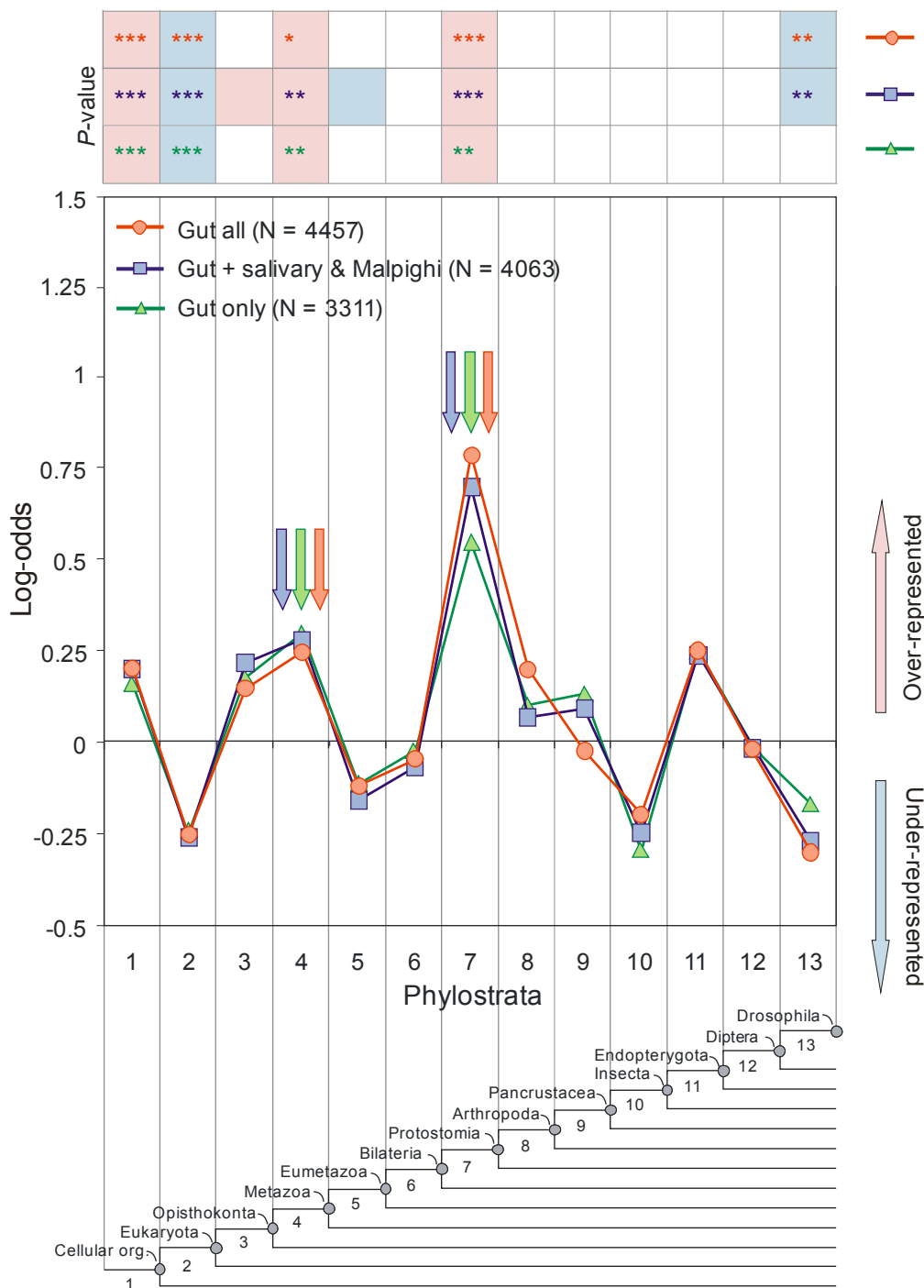
4.11. PROBAVNI SUSTAV

Probavni sustav je na filostratigrafskoj mapi vinske mušice predstavljen skupom od 4457 ekspresija. Pritom su napravljene tri analize.

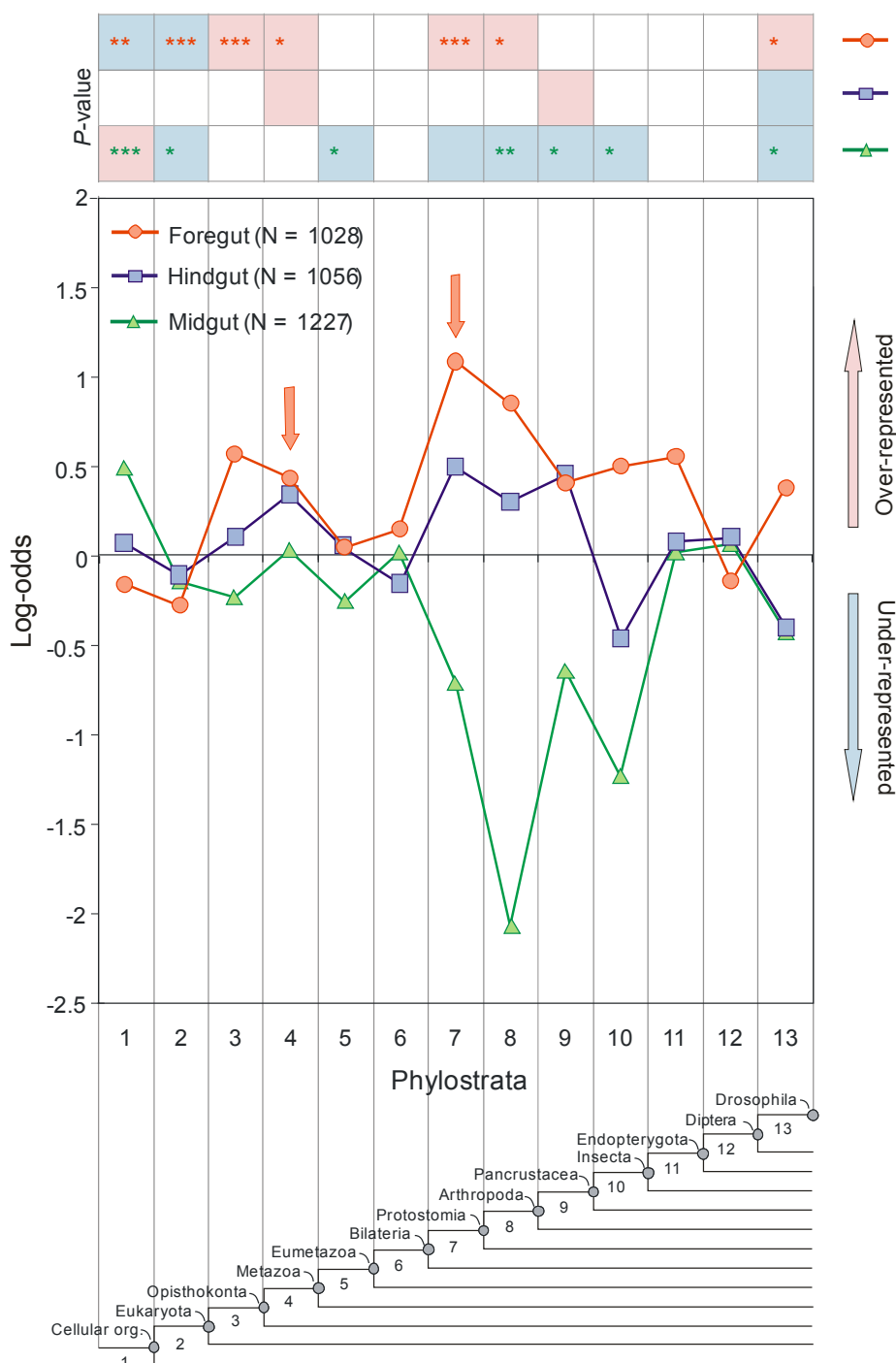
U prvoj analizi (slika 16) je sustav definiran na tri načina: najuža definicija uključivala je ekspresije samo za temeljnu strukturu probavila (zelena krivulja), a naknadno su u skup dodane i ekspresije Malpighijevih cjevčica i slinskih žlijezda (plava krivulja), te mišića i živaca vezanih za probavilo (crvena krivulja). Sve su tri definicije pokazale na mapi vrlo slične rezultate, te se u FS 4 (LCA Metazoa) i FS 7 (LCA Protostomia) mogu opaziti statistički značajna odstupanja frekvencije ekspresija od očekivanih vrijednosti.

U drugoj analizi (slika 17) je najuži skup ekspresija za probavni sustav (zelena krivulja sa slike 16) podijeljen na prednje, srednje stražnje probavilo, jer u embrionalnom razvoju srednji dio probavila nastaje od endoderma, dok terminalni dijelovi nastaju kao uvrati ektoderma. Rezultati analize pokazuju da značajna odstupanja u FS 4 i 7 probavnog sustava (slika 16) nastaju većim dijelom kao rezultat doprinosa ekspresija prednjeg probavila (označeno crvenim strelicama na slici 17). Stražnje probavilo u analizi ne pokazuje značajna odstupanja, dok su u slučaju srednjeg probavila odstupanja uglavnom u negativnom području.

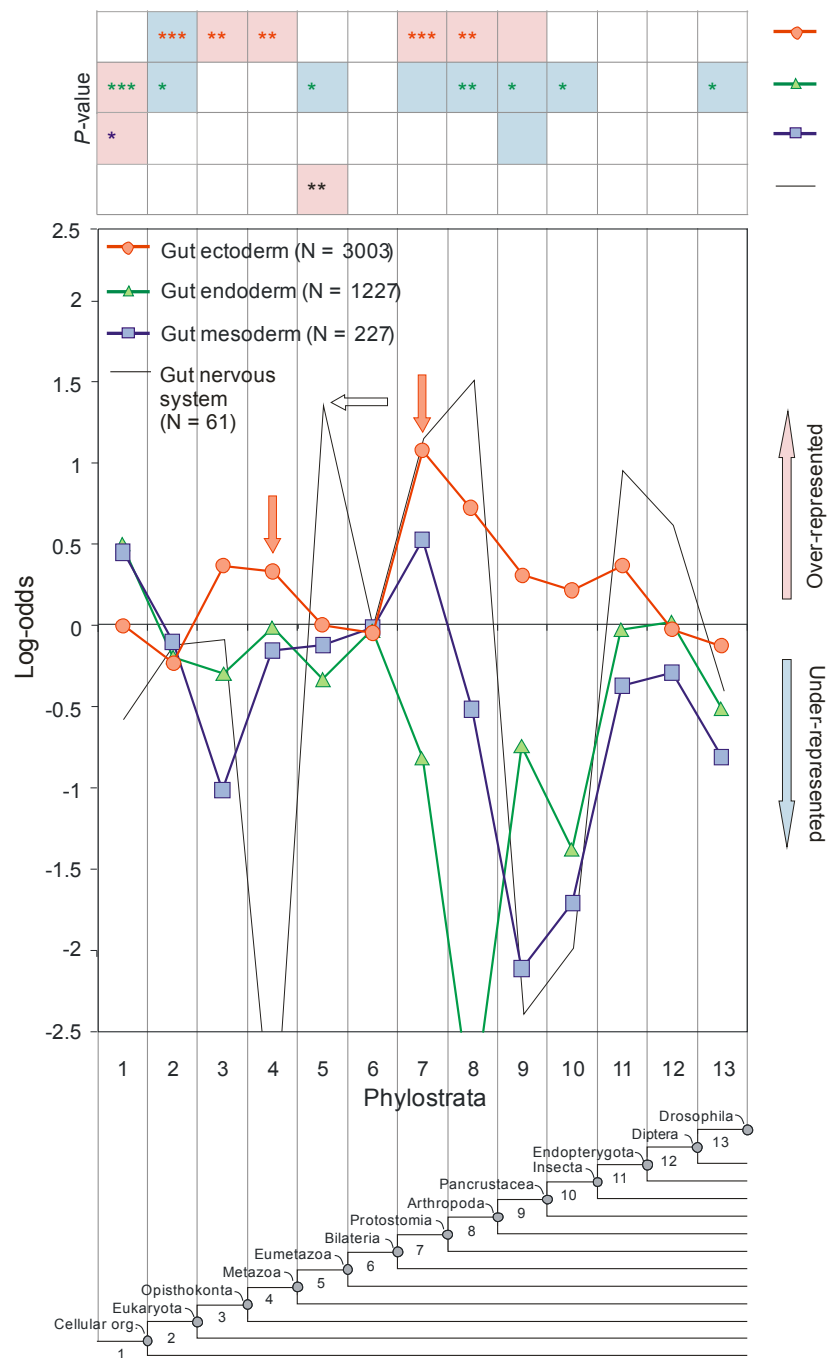
U trećoj analizi (slika 18) je najširi skup ekspresija za probavni sustav (crvena krivulja sa slike 16) podijeljen prema porijeklu od zametnih listića, a zasebno je analiziran i živčani sustav vezan za probavilo (tzv. stomatogastrični živčani sustav). Rezultati su pokazali važnost doprinosa ektodermalnih dijelova probavila za statistički značajna odstupanja ukupnog skupa ekspresija probavnog sustava, jer su FS 4 i 7 zastupljeni više od očekivanja. Živčani sustav probavila ima značajan signal u FS 5 (LCA Eumetazoa), što odgovara uzorku cijelog živčanog sustava (slika 9).



Slika 16. – Statistička analiza ekspresijskih domena probavnog sustava na filostratigrafskoj mapi. Trinaest filostratuma koji odgovaraju filogenetskim međučvorovima (internodijima – niže na prikazu) obrubljeni su vertikalnim linijama i označavaju skupine gena koji vuku svoje porijeklo iz odgovarajućih evolucijskih perioda. U svakom filostratumu se učestalost (frekvencija) ekspresijskih domena u anatomskim strukturama koje pripadaju različito definiranom probavilu (crveno, plavo i zeleno) uspoređuje s učestalošću cijelog uzorka, a devijacije su prikazane pomoću log-odds (y-os). Log-odds vrijednosti nula znači da se frekvencije ekspresija u filostratumu i u cijelom uzorku ne razlikuju, dok pozitivne i negativne vrijednosti upućuju na veću ili manju zastupljenost od očekivanja. Značajnost devijacija prikazana je u tablici s P-vrijednostima (gornji dio prikaza; *P < 0,05; **P < 0,01, ***P < 0,001; dvosmjerni hipergeometrijski test s FDR-korekcijom za višestruko testiranje prema broju filostratuma). Značajna su odstupanja u gornjem panelu označena blijedocrvenom (pozitivna) ili svijetloplavom (negativna) bojom. Odstupanja koja su izgubila značajnost primjenom FDR-korekcija označena su obojenim poljima bez zvjezdica. U legendi iznad krivulja prikazani su odgovarajući ukupni brojevi ekspresija. Plave, zelene i crvene strelice ukazuju na važna razdoblja u evoluciji probavnoga sustava: pretpostavljeni najraniji nastanak (kod prvih Metazoa) i vjerojatno vrlo važne elaboracije (kod pojave protostomičnih životinja).



Slika 17. – Statistička analiza ekspresijskih domena prednjeg, srednjeg i stražnjeg dijela probavila na filostratigrafskoj mapi genoma vinske mušice. Trinaest filostratuma koji odgovaraju filogenetskim međučvorovima (internodijima – niže na prikazu) obrubljeni su vertikalnim linijama i označavaju skupine gena koji vuku svoje porijeklo iz odgovarajućih evolucijskih perioda. U svakom filostratumu se učestalost (frekvencija) ekspresijskih domena u anatomske strukture koje pripadaju prednjem dijelu probavila (crveno), stražnjem dijelu (plavo) i srednjem dijelu (zeleno) uspoređuje s učestalošću cijelog uzorka, a devijacije su prikazane pomoću log-odds (y-os). Log-odds vrijednosti nula znači da se frekvencije ekspresija u filostratumu i u cijelom uzorku ne razlikuju, dok pozitivne i negativne vrijednosti upućuju na veću ili manju zastupljenost od očekivanja. Značajnost devijacija prikazana je u tablici s P-vrijednostima (gornji dio prikaza; *P < 0,05; **P < 0,01, ***P < 0,001; dvosmjerni hipergeometrijski test s FDR-korekcijom za višestruko testiranje prema broju filostratuma). Značajna su odstupanja u gornjem panelu označena blijedocrvenom (pozitivna) ili svijetloplavom (negativna) bojom. Odstupanja koja su izgubila značajnost primjenom FDR-korekcija označena su obojenim poljima bez zvjezdica. U legendi iznad krivulja prikazani su odgovarajući ukupni brojevi ekspresija. Crvene strelice naglašavaju da su FS koji su na slici 15 zastupljeni značajno više od očekivanja rezultat doprinosa ekspresija koje pripadaju prednjem dijelu probavila.



Slika 18. – Statistička analiza ekspresijskih domena probavila prema porijeklu od zametnih listića, te živčanog sustava vezanog za probavilo na filostratigrafskoj mapi. Trinaest filostratuma koji odgovaraju filogenetskim međučvorovima (internodijima – niže na prikazu) obrubljeni su vertikalnim linijama i označavaju skupine gena koji vuku svoje porijeklo iz odgovarajućih evolucijskih perioda. U svakom filostratumu se učestalost (frekvencija) ekspresijskih domena u anatomskim strukturama koje pripadaju ektodermu probavila (crveno), endodermu probavila (plavo), mezodermu probavila (zeleno) i živčevlju probavila (crno) uspoređuje s učestalošću cijelog uzorka, a devijacije su prikazane pomoću log-odds (y-os). Log-odds vrijednosti nula znači da se frekvencije ekspresija u filostratumu i u cijelom uzorku ne razlikuju, dok pozitivne i negativne vrijednosti upućuju na veću ili manju zastupljenost od očekivanja. Značajnost devijacija prikazana je u tablici s P-vrijednostima (gornji dio prikaza; *P < 0,05; **P < 0,01, ***P < 0,001; dvosmjerni hipergeometrijski test s FDR-korekcijom za višestruko testiranje prema broju filostratuma). Značajna su odstupanja u gornjem panelu označena blijedocrvenom (pozitivna) ili svijetloplavom (negativna) bojom. Odstupanja koja su izgubila značajnost primjenom FDR-korekcija označena su obojenim poljima bez zvjezdica. U legendi iznad krivulja prikazani su odgovarajući ukupni brojevi ekspresija. Strelica s crnim obrubom ukazuje na višu zastupljenost od očekivanja FS 5 za živčani sustav, što odgovara uzorku za cijeli živčani sustav na slici 8. Crvene strelice naglašavaju važnost doprinosa ektodermalnih ekspresija za probavilo u FS 4 i 7, zbog čega se uočavaju visoke zastupljenosti u odgovarajućim FS i na slici 15, gdje je prikazan cjelokupni probavni sustav.

5. RASPRAVA

5.1. EPIDERMALNI SUSTAV (EPIDERM)

Epidermalni sustav je evoluirao kod LCA Metazoa. Već su najranije višestanične životinje posjedovale plohe epidermalnih stanica čvrsto vezanih za subepidermalni izvanstanični matriks. Rezultati pokazuju da je epiderm u užem smislu, tretiran odvojeno od trahealnog sustava i proksimalnih dijelova probavila, doživljavao značajne adaptivne promjene gotovo neprekinuto još od pojave prvih protostomičnih životinja (FS 7). Kao sustav koji je neprestano u komunikaciji s vanjskim okolišem, s kojim izmjenjuje tvari i informacije, epiderm je tijekom evolucije životinja neprestano bio pod selekcijskim pritiscima koji su uzrokovali brojne promjene u njegovoj strukturi i funkcijama. Na analizi (slika 7) je vidljivo kako se u gotovo svim FS nakon evolucije Eukaryota epidermalne ekspresije javljaju s frekvencijama većim od očekivanih. Tijekom kasnijih razdoblja u evoluciji epiderma nastale su različite strukture i tipovi stanica koji se mogu izvesti iz epidermalnih stanica, te je nekoliko puta konvergentno došlo do evolucije različitih tipova zaštitnog sloja (kutikule). Metabolički putevi za sintezu najčešćih kutikularnih spojeva (hitin, kolagen i dr.) bili su prisutni već i prije pojave Metazoa, ali su do izražaja došli tek kad su se mogli uložiti u matriks glikokaliksa, kako bi stvorili manje ili više čvrsti ovoj oko epiderma (Schmidt-Rhaesa 2007). Zbog svoje varijabilne strukture i čvrstoće, u okviru kutikule mogli su se razviti različiti tipovi nastavaka, od onih koji se koriste kao receptori, do onih koji služe za zaštitu, obranu ili prehranu. U kombinaciji s različitim tipovima stanica koje su nastale iz epidermalnih stanica (mišićne, osjetne, potporne, žljezdane i dr.), fleksibilna kutikula i varijabilni broj trepetljika po stanici omogućili su velik broj specifičnih prilagodbi ovog organskog sustava kod različitih skupina životinja.

Očekivali bismo da će se u FS 4 (LCA Metazoa) javiti statistički značajan signal za epidermalni sustav, no u slučaju usko definiranog epiderma takav signal nismo dobili. Međutim, uključanje proksimalnih dijelova probavila i trahealnog sustava (slike 10 i 17) u epidermalni skup ekspresija (slika 8) proizvelo je snažan signal i u toj ekspresijskoj domeni. Zajedničko sagledavanje ekspresija ovih sustava opravdano je iz razloga što su oni kod vinske mušice prekriveni kutikularnim ovojem i predstavljaju sučelje okrenuto prema vanjskom okolišu preko kojeg organizam prima podražaje, te uzima potrebne tvari i izmjenjuje plinove. Ovakvo se ustrojstvo epiderma odražava u filogenetski mlađim FS, gdje zahvaljujući novim funkcijama opažamo neprestane evolucijske elaboracije.

5.2. ŽIVČANI SUSTAV

Živčane stanice su evoluirale kod LCA Eumetazoa i to rezultati jasno pokazuju (slika 9). Iako se oblici električne signalizacije mogu naći i kod biljaka, a različite molekularne komponente živčanih sustava, kao i provođenje informacija kroz tijelo na koordinirani način i kod spužvi, živci prepoznatljivi na staničnoj razini mogu se naći tek kod žarnjaka. Već se kod Cnidaria zapaža trend prema stvaranju koordinacijskih centara i stanica specifičnog prostornog rasporeda, kao što su živčani prstenovi, koji se smatraju oblicima središnjeg živčanog sustava, a bitni su za koordinaciju ponašanja (Grimmelikhuijzen i Westfall 1995, Mackie 2004, Garm i sur. 2007, Koizumi 2007, Galliot i sur. 2009). Mogućnost da je već LCA Eumetazoa imao CNS dobila je potporu u našoj analizi (slika 9). Unutar Eumetazoa se javlja trend prelaska s multipolarnih stanica na dobro definirane živce s centrom za koordinaciju (mozak), a paralelno s time, sinapse između živčanih stanica postaju jednosmjerne, s jasno definiranom presinaptičkom i postsinaptičkom stanicom (Schmidt-Rhaesa 2007).

Kod Bilateria se javlja osobita potreba za specijaliziranim perifernim živčanim sustavom, čiji se živci nalaze ili između epidermalnih stanica ili bazalno od njih (ali ipak u nekoj vezi sa stijenkom tijela). Također se javlja povećana potreba za informacijama iz vanjskog svijeta, što je rezultiralo raznim selekcijskim pritiscima. Njihov je odraz vidljiv u našim rezultatima analize PNS-a (slika 9), pa kod LCA Bilateria (FS 6), LCA Arthropoda (FS 8) i LCA Insecta (FS 10) uočavamo statistički značajna odstupanja u frekvencijama ekspresija u odnosu na očekivane vrijednosti, tj. uočavamo jasne signale koji upućuju na vjerojatno važne adaptivne događaje.

5.3. RESPIRATORNI (TRAHEALNI) SUSTAV

Traheole su najsitniji ogranci trahealnog sustava, koji dovode kisik sve do samih stanica, a u nekim slučajevima i u točno određene dijelove stanica. Visoko odstupanje od očekivane vrijednosti frekvencije ekspresija za traheole kod LCA Insecta (FS 10, slika 11) poklapa se sa sadašnjim saznanjima o strukturi trahealnog sustava kod različitih skupina Arthropoda. Kao što je spomenuto, trahealni sustav nalazimo kod Onychophora, Myriapoda, Hexapoda (Insecta, Protura, Diplura i Collembola) i dijela Chelicerata (pauci). Međutim, kod pauka se traheje ne granaju do svih stanica, nego samo u nabore koje neprestano oplakuje hemolimfa preuzimajući kisik, kojeg

tada raznosi po tijelu (Matoničkin i sur. 2009). Bromhall (1987) pronalazi najsitnije traheje kod pauka roda *Argyroneta* promjera 1 mikrometar, dok su terminalne traheole kukaca najčešće tek 0,1 mikrometar ili čak manjeg promjera (Wigglesworth i Lee 1982, Bromhall 1987). Prisutnost traheola upućuje na odvedeniju verziju trahealnog sustava kod kukaca, što potvrđuje i pojava neočekivano visokog porasta u broju ekspresija u FS 10. Važno je naglasiti da se u slučaju traheola radi samo o indikativnom trendu, jer sama statistička pouzdanost nalaza raste s brojem ekspresija, kojih za traheole imamo samo pet. Značajnost nalaza raste kada uzmemo u obzir cijeli skup genskih ekspresija koji određuje trahealni sustav, a kod kojeg se također u FS 10 javlja statistički značajno odstupanje od očekivane vrijednosti frekvencija (ukupno je u FS 10 trahealni sustav predstavljen 21 genskom ekspresijom).

Postoje još neke razlike u strukturi trahealnog sustava između pauka i kukaca (osim nepostojanja traheola kod pauka). Druga razlika je postojanje zračnih vrećica kod kukaca koje pauzi nemaju (iako je Hill (1977) pokazao da se glavna trahealna debla pauka roda *Phiddipus* djelomično mogu ispuhati). Treća razlika povezana je s povremenim stvaranjem poprečnih veza (anastomoza) između traheja kod kukaca (čega također nema u pauka), zbog čega jedino kukci mogu propuhivati zrak kroz svoje tijelo. Četvrta razlika tiče se naglog grananja glavnih trahealnih debala u veliki broj finih traheja, koje se uočava kod pauka, ali ne i kukaca. Na kraju, trahealni sustavi pauka otvaraju se odušcima koji se uvijek nalaze ventralno, i to na maksimalno dva kolutića zatka. S druge strane, kukci obično imaju oduške u puno više kolutića, uključujući i one prsne, koji se najčešće otvaraju lateralno (Bromhall 1987). Ovakve i slične razlike u strukturi trahealnih sustava između Insecta i skupina Arthropoda koje se na razvojnoj liniji vinske mušice nalaze bazalno od njih pridonose objašnjenju snažnog signala kojeg uočavamo u FS 10 (slika 10).

Značajan signal trahealnog sustava kod LCA Pancrustacea (FS 9) ukazuje na moguću vezu između traheja i škrga (slika 10). Blisku vezu između rakova i kukaca potvrdila su brojna molekularno-biološka istraživanja (Schultz i Regier 2000, Giribet i Ribera 2000, Nardi i sur. 2003). Franch-Marro i sur. (2006) ukazuju na moguće zajedničko porijeklo traheja u kukaca i škrga u rakova, a zaključke temelje na homologiji gena koji induciraju trahealni sustav s genima rakova koji imaju ulogu u razvoju škrga (*trachealless* (*trh*) i *ventral veinless* (*vvl*)). Naši rezultati daju potporu ovoj hipotezi. Ukratko, škrge rakova vezane su uz noge (škrge se obično razvijaju kao jasno razlučive dorzalne grane epipodita (Brusca i Brusca 1990)), kao što postoji i veza između respiratornih organa i nogu kod vinske mušice kod koje signaliziranje pomoću *wingless*

receptora služi kao genetski „prekidač“. O prisutnosti ovog signala ovisi hoće li se primordijalna stanica razviti u smjeru noge ili u smjeru trahealnog sustava (Franch-Marro i sur. 2006).

Također se u našim rezultatima za ekspresije trahealnog sustava može opaziti kako su adaptivni trendovi u njegovoj evoluciji, ovisno o promatranom skupu ekspresija (ovisno uključujući li se u naš uzorak i primordijalna tkiva – slika 10), više ili manje kontinuirani. Tako se statistički značajni signali javljaju i nakon pojave Insecta, što ukazuje da je i u mlađim FS nastavljen pritisak na selekciju sve elaboriranijih verzija trahealnih sustava.

5.4. CIRKULATORNI (OPTJECAJNI) SUSTAV

Ekspresija homolognih gena u *Drosophila* i Craniata (Bodmer i Venkatesh 1998, Tanaka i sur. 1999) ukazuje u ekstremnom slučaju na hipotezu da je LCA Bilateria imao optjecajni sustav s kontraktilnom žilom (De Robertis i Sasai 1996), dakle nekom vrstom primitivnog „srca“. Međutim, moguće je i objašnjenje prema kojem je predak Bilateria imao odgovarajuće gene za takav sustav, ali su oni imali različite funkcije (Schmidt-Rhaesa 2007). Rezultati filostratigrafske analize ekspresija za srce (slika 13) podupiru teoriju o postojanju srca kod LCA Bilateria, jer se u odgovarajućem filostratumu u sva tri skupa ekspresija za srce javlja značajan pozitivni signal.

Hartenstein i Mandal (2006) istražuju spekulacije o homologiji srca vinske mušice i srca kralješnjaka, koja se temelji npr. na konzerviranoj ekspresiji TF *Tinman* i njegovog homologa *Nkx2.5* u kralješnjaka. Na temelju komparativnih morfoloških i molekularnih podataka o ekspresiji gena kod embrionalnog optjecajnog sustava *Drosophila* i kralješnjaka, zaključeno je da su mnogobrojne sličnosti između njih odraz istinske homologije. Autori međutim naglašavaju važnost složenosti tkiva kod srca kralješnjaka, jer ne postoje dokazi da je srce vinske mušice išta više „homologno“ bilo miokardu, bilo endokardu, bilo endotelu općenito kod kralješnjaka. Iz ovog razloga je važno uzeti „homologije“ ovakvog tipa s dozom rezerve.

Čak i ako se s vremenom ova teorija pokaže pogrešnom, ostaje činjenica da je kod pretka Bilateria bio ekspresiran statistički značajno velik broj gena za „srce“. Bilo da ga definiramo vrlo usko, samo kao skupinu perikardijalnih stanica (crvena krivulja na slici 13), bilo vrlo široko, kao dorzalnu žilu zajedno s perikardom, kardijalnim mezodermom i limfnim žlijezdama (plava krivulja na istoj slici), u svakom se slučaju u FS 6 morao dogoditi neki važni adaptivni korak.

5.5. RASPLODNI (REPRODUKTIVNI) SUSTAV

I seksualni i (agametski) aseksualni tip razmnožavanja razvili su se mnogo prije pojave prvih višestaničnih životinja. Kod diploblastičnih životinja javlja se tendencija seksualnih stadija života u istraživanju novih okoliša, a aseksualnih stadija u brzom širenju lokalnom, već zauzetom sredinom. Kod Bilateria su široko rasprostranjena oba načina razmnožavanja, s tim da je razvijeno i aseksualno razmnožavanje preko gameta (partenogeneza). Pretpostavlja se da je LCA Bilateria bio sposoban za agametsko aseksualno, kao i seksualno razmnožavanje, ali su se obrasci razmnožavanja unutar skupine mijenjali vrlo često i na vrlo različite načine.

Gledajući čitavo filogenetsko stablo, što dalje idemo u prošlost, tipovi razmnožavanja postaju sve slabija osobina za predviđanje filogenetskog porijekla skupina. Gonade su vjerojatno evoluirale nekoliko puta paralelno i one mogu biti različitog porijekla. Kod odvedenijih skupina zapaža se trend od vanjske prema unutarnjoj oplodnji te, vezano uz to, prema elaboraciji rasplodnih organa, načina pakiranja gameta, te zaštite i prehrane embrija (Schmidt-Rhaesa 2007). Masno tijelo, organ koji služi za pohranu masti, ali ima i ulogu u humoralnom odgovoru imunosnog sustava, s gonadama dijeli zajedničko embrionalno porijeklo. Iako specifikacija masnog tijela i gonada još nije u potpunosti razjašnjena, prema modelu koji predlažu Riechmann i sur. (1998), pri diferencijaciji mezoderma vinske mušice faktori poput *tinman*, *engrailed* i *wingless* omogućuju somatski razvoj gonada, dok *serpent* promovira razvoj masnoga tijela.

Velika raznolikost u građi i funkciji reproduktivnih sustava kod životinja, koja je odraz njihove evolucijske plastičnosti, kao i relativno mala veličina uzorka ekspresija za reproduktivni sustav u *Drosophila*, ostavili su traga i na našoj analizi. Tako filostratigrafska analiza užeg skupa ekspresija nije pokazala nikakva značajna odstupanja, dok je analiza šire definiranog sustava, u koji su uključene i ekspresije masnoga tijela, pokazala odstupanja samo u filogenetski najstarijim FS (kod pojave prvih staničnih organizama i kod pojave Eukaryota).

5.6. MIŠIĆNI (MUSKULATORNI) SUSTAV

Molekularna osnova mišića je veza između dva proteina, aktina i miozina, čije usklađene kretnje čine temelj mišićnih kontrakcija. Za evoluciju mišića bitno je razumijevanje strukture citoskeleta, čiji temelj kod svih eukariotskih stanica čine proteini aktin i tubulin. Čak i kod nekih

prokariota nađeni su citoskeleti čije su gradivne molekule blisko srodne aktinu i mogu se smatrati njegovim prethodnikom (Jones et al. 2001, van den Ent et al. 2001). Štoviše, Hartman i Fedorov (2002) postavili su hipotezu prema kojoj je stabilnost citoskeleta prokariotima koji su ga imali davala prednost prilikom „gutanja“ drugih stanica, koje je dovelo do fuzije obje stanice (teorija endosimbioze, Margulis 1981). Zanimljivo, jedini pozitivni signal sa statističkom značajnošću u našoj analizi mišićnog sustava može se uočiti već kod pojave prvih stanica (FS 1, slika 15). Kako je materijal koji izgrađuje mišiće vezan za citoskelet, ovakav rezultat daje potporu hipotezi o mogućoj ulozi stabilnosti citoskeleta u daljnoj evoluciji života (Hartman i Fedorov 2002).

Izolirane „mišićne“ stanice (ipak sposobne i za koordinirane akcije) javljaju se već kod ranih Metazoa (Schmidt-Rhaesa 2007). Dalje se mišići razvijaju prema tkivnom nivou, prvo kao epitelno-mišićne stanice (Cnidaria), a zatim kao mišićna vlakna (Ctenophora i Bilateria). LCA Bilateria vjerojatno je imao karakteristični uzorak rasporeda mišićnih slojeva, tzv. kožno-mišićni sloj, koji je u vezi s fleksibilnim oblikom tijela i oslanja se na hidrostatski tlak tjelesne tekućine. Životinje s čvrstim skeletima razvile su specijaliziranije mišićne sustave, kod kojih su se mišići mogli osloniti bilo na čvrstu vanjsku kutikulu (Arthropoda), bilo na endoskelet (Chordata). Tzv. poprečno-prugasti uzorak raspodjele mišićnih vlakanaca (čije kretanje predstavlja osnovu mišićnih kontrakcija) razvio se u evoluciji više puta, kada god se javila funkcionalna potreba za brzim i dobro definiranim pokretima. Unatoč svim ovim prilagodbama, prema rezultatima naše analize čini se kako se mišićni sustav uglavnom oslanja na filogenetski najstarije gene, jer se unutar mlađih FS uglavnom opažaju frekvencije ekspresija manje od očekivanih vrijednosti, što sugerira da je u genom vinske mušice ulazio relativno malen broj gena (slika 15).

5.7. PROBAVNI SUSTAV

Evolucija probavila bila je jedna od prvih posljedica nastanka višestaničnih životinja, jer je mogućnost specijalizacije pojedinih stanica unutar višestaničnog organizma rezultirala evolucijom zametnih listića, pri čemu je ektoderm stvorio vanjski zaštitni ovoj, a endoderm unutrašnji sloj koji je omogućio apsorpciju hrane. Stvaranje zametnih listića obično znači i stvaranje probavila, no općenito se smatra kako Porifera nemaju probavilo niti u odraslom niti u ličinačkom stadiju (Leys i Eerkes-Medrano 2005), iako kod više skupina postoje naznake gastrulacije (Efremova 1997, Boury-Esnault i sur. 1999, Leys i Degnan 2002, Leys 2004).

Rezultati filostratigrafske analize probavnog sustava (slika 16) upućuju na zaključak da je većina gena potrebnih za nastanak probavila bila prisutna već kod pretka Metazoa, iako se pravo probavilo najvjerojatnije javilo jedan filostratum kasnije. Manja frekvencija ekspresija probavnog sustava od očekivane u FS 5 (LCA Eumetazoa) mogla bi se u tom slučaju objasniti pojavom relativno malog broja ekspresija koje su nedostajale kako bi izgradnja probavila bila provedena i u stvarnosti. Kod nastanka Protostomia (FS 7) ponovno je došlo do pojave neočekivano velikog broja novih ekspresija, što bi se moglo dovesti u vezu s pojavom prohodnog probavila. Ovo je bio važan događaj u evoluciji probavila jer je usmjerenošću probave bila omogućena evolucija specijaliziranih struktura za obradu hrane i učinkovitiju prehranu. Rezultati na slici 17 pokazuju da se podjela probavila na prednji, srednji i stražnji dio vjerojatno dogodila istovremeno s pojavom prohodnog probavila, što je i bilo za očekivati s obzirom na pojavu usmjerenog kretanja hrane. Razvoj različitih hranidbenih struktura prilagođenih za iskorištavanje raznolikih izvora hrane, kao i novih i boljih osjetila vezanih za kutikulu prednjeg dijela probavila utjecao je i na signale na našoj filostratigrafskoj analizi (slika 17, crvena krivulja), zbog čega se i nakon pojave Protostomia (FS 7) mogu opaziti veće frekvencije ekspresija od vrijednosti koje očekujemo. To je ostavilo traga i na cjelokupnom ektodermu probavila (slika 18), pa se i tu javljaju slični trendovi.

6. ZAKLJUČAK

Filostratigrafska analiza ekspresija u različitim organskim sustavima na mapi genoma vinske mušice pokazala je više zanimljivih rezultata. Mišićni i reproduktivni sustav pokazali su se uglavnom evolucijski inertnima. Analiza epiderma ukazala je na njegovu dinamičnu evoluciju u filogenetski mlađim filostratumima, dok je signal koji bi upućivao na njegov evolucijski nastanak vidljiv kod analize šireg uzorka genskih ekspresija. Kod živčanog sustava rezultati su potvrdili dosadašnja saznanja o njegovom porijeklu, ali i ukazali na mogućnost ranijeg nastanka CNS-a u odnosu na trenutne spoznaje, što daje potporu nedavnim istraživanjima kod Cnidaria. Pri analizi optjecajnog sustava, rezultati potvrđuju hipotezu nastanka srca kod LCA Bilateria, dok rezultati analize trahealnog sustava naglašavaju razlike između kukaca i bazalnih Arthropoda (npr. pauka), te ukazuju na moguće zajedničko porijeklo traheja kukaca i škrga rakova. Filostratigrafski signal za probavni sustav javlja se vrlo rano, već kod pretka Metazoa, što je zanimljivo u svjetlu istraživanja koja su ukazala na oblik gastrulacije već kod Porifera, iako se probavilo razvilo u pravom smislu tek kod Eumetazoa.

7. LITERATURA

- Adams, R.J. & Pollard, T.D. (1986): Propulsion of organelles isolated from *Acanthamoeba* along actin filaments by myosin-I. *Nature* **322**: 754-756.
- Aguinaldo, A. M. A., Turbeville, J. M., Linford, L. S., Rivera, M. C., Garey, J. R., Raff, R. A. & Lake, J. A. (1997): Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals. *Nature* **387**: 489-493.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990): Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- Arendt, D. (2004): Comparative aspects of gastrulation. In Stern, C. (ed.), *Gastrulation. From cells to embryos* pp. 679–693. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor.
- Ax, P. (1985): The position of the Gnathostomulida and Platyhelminthes in the phylogenetic system of Bilateria. In: *The Origins and Relationships of Lower Invertebrates*, Conway Morris, S., George, J.D., Gibson, R. & Platt, H.M. (eds.). *Syst. Assoc. Spec. Vol.* **28**: 168-180.
- Ax, P. (1996): *Multicellular Animals I. A New Approach to the Phylogenetic Order in Nature*. Springer, Berlin.
- Bagby, R.M. (1966): The fine structure of myocytes in the sponges *Microciona prolifera* (Ellis and Solander) and *Tedania ignis* (Duchassaing and Michelotti). *J. Morphol.* **118**: 167-182.
- Bagby, R.M. (1970): The fine structure of pinacocytes in the marine sponge *Microciona prolifera* (Ellis and Solander) *Z. Zellforsch.* **105**: 579-594.
- Balavoine, G. & Adoutte, A. (1998): One or Three Cambrian Radiations? *Science* **280**: 397-398.
- Björn, L.O. (2008): *Photobiology: The Science of Life and Light*, 2nd Edn. Springer, New York.
- Bodmer, R. & Venkatesh, T.V. (1998): Heart development in *Drosophila* and vertebrates: conservation of molecular mechanisms. *Dev. Genetics* **22**: 181-186.
- Bourlat, S.J., Nielsen, C., Lockyer, A.E., Timothy, D., Littlewood, J. & Telford, M.J. (2003): *Xenoturbella* is a deuterostome that eats molluscs. *Nature* **424**: 925-928.
- Boury-Esnault, N., Efremova, S.M., Bézac, C., & Vacelet, J. (1999): Reproduction of a hexactinellid sponge: First description of gastrulation by cellular delamination in the Porifera. *Invertebr. Reprod. Dev.* **35**: 187-201.
- Bromhall, C., (1987): Spider tracheal systems. *Tissue & Cell* **19**: 793-807.
- Brusca, G. J., Brusca, R. C. & Gilbert, S. F. (1997): Characteristics of metazoan development. In Gilbert, R. & Raunio, A.M. (ed.), *Embryology. Constructing the organism*, pp 3–19. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Brusca, R.C. & Brusca, G.J. (1990): *Invertebrates*, Sinauer, Sunderland.

- Butterfield, N.J. (2000): *Bangiomorpha pubescens* n. gen., n. sp.: implications for the evolution of sex, multicellularity and the Mesoproterozoic / Neoproterozoic radiation of eukaryotes. *Paleobiology* **26**: 386-404.
- Carapelli, A., Liò, P., Nardi, F., van der Wath, E., Frati, F. (2007): Phylogenetic analysis of mitochondrial protein coding genes confirms the reciprocal paraphyly of Hexapoda and Crustacea. *BMC Evol. Biol.* **7** Suppl **2**: S8.
- Carroll, S.B. (2001): Chance and necessity: the evolution of morphological complexity and diversity. *Nature* **409**: 1102-1109.
- Carroll, S.B. (2005): Evolution at two levels: On genes and form. *PLoS Biol.* **3**: e245.
- Castillo-Davis, C.I. & Hartl, D.L. (2003): GeneMerge – post-genomic analysis, data mining, and hypothesis testing. *Bioinformatics* **19**: 891-892.
- Chen, J.Y., Oliveri, P., Li, C.-W., Zhou, G.Q., Gao, F., Hagadorn, J.W., Peterson, K.J. & Davidson, E.H. (2000): Precambrian animal diversity: putative phosphatized embryos from the Doushantuo Formation of China. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 4457-4462.
- Conway Morris, S. (1998): Early Metazoan Evolution: Reconciling Paleontology and Molecular Biology. *Am. Zool.* **38**: 867-877.
- Cook, C.E., Smith, M.L., Telford, M.J., Bastianello, A. & Akam, M. (2001): *Hox* genes and the phylogeny of the arthropods. *Curr. Biol.* **11**: 759-763.
- Cowen, R. (2000): History of life, 3rd Edn. Blackwell Science, Oxford.
- De Robertis, E.M. & Sasai, Y. (1996): A common plan for dorsoventral patterning in Bilateria. *Nature* **380**: 37-40.
- Denis, H. (1997): L'origine de la gastrulation. *Médecine/sciences*, **13**: 1503-1515.
- Domazet-Lošo, T. & Tautz, D. (2003): An evolutionary analysis of orphan genes in Drosophila. *Genome Research* **13**: 2213-2219.
- Domazet-Lošo, T., Brajković, J. & Tautz, D. (2007): A phylostratigraphy approach to uncover the genomic history of major adaptations in metazoan lineages. *Trends in Genetics* **23**: 533-539.
- Edgecombe, G.D., Wilson, G.D.F., Colgan, D.J., Gray, M.R. & Cassis, G. (2000): Arthropod cladistics: combined analysis of histone H3 and U2 snRNA sequences and morphology. *Cladistics* **16**: 155-203.
- Efremova, S.M. (1997): Once more on the position among Metazoa— Gastrulation and germinal layers of sponges. *Berliner Geowiss. Abh.* **20**: 7-15.
- Ehlers, U. (1992a): On the fine structure of *Paratomella rubra* Rieger & Ott (Acoela) and the position of the taxon *Paratomella* Dörjes in a phylogenetic system of the Acoelomorpha (Plathelminthes). *Microfauna Marina* **7**: 265-293.
- Ertas, B., von Reumont, B.M., Wägele, J.W., Misof, B., Burmester, T. (2009): Hemocyanin suggests a close relationship of remipedia and hexapoda. *Mol. Biol. Evol.* **26**: 2711-2718.

- Erwin, D.H. & Davidson, E.H. (2002): The last common bilaterian ancestor. *Development* **129**: 3021-3032.
- Extavour, C.G. & Akam, M. (2003): Mechanisms of germ cell specification across the metazoans: epigenesis and preformation. *Development* **130**: 5869-5884.
- Franch-Marro, X., Martin, N., Averof, M. & Casanova, J. (2006): Association of tracheal placodes with leg primordia in *Drosophila* and implications for the origin of insect tracheal systems. *Development* **133**: 785-790.
- Friedrich, M. & Tautz, D. (1995): Ribosomal DNA phylogeny of the major extant arthropod classes and the evolution of myriapods. *Nature* **376**: 165-167.
- Gai, Y., Song, D., Sun, H., Yang, Q. & Zhou, K. (2008): The complete mitochondrial genome of *Symphylella* sp. (Myriapoda: Symphyla): Extensive gene order rearrangement and evidence in favor of Progoneata. *Mol. Phylogenet. Evol.* **49**: 574-585.
- Galliot, B., Quiquand, M., Ghila, L., de Rosa, R., Miljkovic-Licina, M., Chera, S. (2009): Origins of neurogenesis, a cnidarian view. *Dev. Biol.* **332**: 2-24.
- Garm, A., Poussart, Y., Parkefelt, L., Ekstrom, P., Nilsson, D.E. (2007): The ring nerve of the box jellyfish *Tripedalia cystophora*. *Cell Tissue Res.* **329**: 147-157.
- Gilbert, S. F. & Raunio, A.M. (1997): Embryology: Constructing the organism. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Gilbert, S. F. (2006): Developmental Biology, 8th Edn. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA.
- Giribet, G. & Ribera, C. (2000): A review of arthropod phylogeny: new data based on ribosomal DNA sequences and direct character optimization. *Cladistics* **16**: 204-231.
- Giribet, G., Carranza, S., Baguña, J., Riutort, M. & Ribera, C. (1996): First molecular evidence for the existence of a Tardigrada + Arthropoda clade. *Mol. Biol. Evol.* **13**: 76-84.
- Giribet, G., Edgecombe, G.D. & Wheeler, W.C. (2001): Arthropod phylogeny based on eight molecular loci and morphology. *Nature* **413**: 157-161.
- Grimmelikhuijzen, C.J., Graff, D., Koizumi, O., Westfall, J.A., McFarlane, I.D. (1989): Neurons and their peptide transmitters in Coelenterates. In: Series, N.A. (Ed.), Serie A: Life Sciences, 188. Plenum Press, New York, pp. 55-109.
- Grimmelikhuijzen, C.J.P., Westfall, J.A. (1995): The nervous systems of Cnidarians. In: Breidbach, O., Kutsch, W. (Eds.), The Nervous Systems of Invertebrates: An Evolutionary and Comparative Approach. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland, pp. 7-24.
- Halliday, A.N. (2001): In the beginning. *Nature* **409**: 144-145.
- Hanström, B. (1928): Vergleichende Anatomie des Nervensystems der wirbellosen Tiere unter Berücksichtigung seiner Funktion. Springer, Berlin.

- Harrison, F.W. & De Vos, L. (1991): Porifera. In: *Microscopic Anatomy of Invertebrates*, Harrison, F.W. & Westfall, J.A. (eds.), Vol. 2: Placozoa, Porifera, Cnidaria, and Ctenophora. Wiley-Liss, New York: 29-89.
- Hartenstein, V. & Mandal, L. (2006): The blood/vascular system in a phylogenetic perspective. *Bioessays* **28**: 1203-1210.
- Hartman, H. & Fedorov, A. (2002): The origin of the eukaryotic cell: a genomic investigation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **99**: 1420-1425.
- Hassanin, A. (2006): Phylogeny of Arthropoda inferred from mitochondrial sequences: strategies for limiting the misleading effects of multiple changes in pattern and rates of substitution. *Mol. Phyl. Evol.* **38**: 100-116.
- Helmkamp, M., Bruchhaus, I. & Hausdorf, B. (2007): Multigene analysis of lophophorate and chaetognath phylogenetic relationships. *Mol. Phylogenet. Evol.* **46**: 206-214.
- Heymons R. (1901): Die Entwicklungsgeschichte der Scolopender. Zoologia, Heft 33, S.1-244, Taf.I-VIII.
- Hilken, G. (1998): Vergleich von Tracheensystemen unter phylogenetischem Aspekt. *Verh. Naturwiss. Ver. Hamburg* **37**: 5-94.
- Hill, D.E. (1977): The Tracheae of Jumping Spiders. *Peckhamia* **1**: 26-30.
- Huxley, J.S. (1942): Evolution: the modern synthesis. Allen and Unwin, London.
- Hwang, U.W., Friedrich, M., Tautz, D., Park, C.J. & Kim, W. (2001): Mitochondrial protein phylogeny joins myriapods with chelicerates. *Nature* **413**: 154-157.
- Jones, L.J.F., Carballido-Lopez, R. & Errington, J. (2001): Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell* **104**: 913-922.
- King, N. (2004): The unicellular ancestry of animal development. *Dev. Cell* **7**: 313-325.
- Knoll, A.H. & Carroll, S.B. (1999): Early Animal Evolution: Emerging Views from Comparative Biology and Geology. *Science* **284**: 2129-2137.
- Knoll, A.H. (1992): The early evolution of eukaryotic organisms: a geological perspective. *Science* **256**: 622-627.
- Knoll, A.H. (1999): A new molecular window on early life. *Science* **285**: 1025-1026.
- Knoll, A.H. (2003): Life on a young planet: the first three billion years of evolution on Earth. Princeton University Press, Princeton, N.J.
- Knoll, A.H., Javaux, E.J., Hewitt, D. & Cohen, P. (2006): Eukaryotic organisms in Proterozoic oceans. *Philos. Trans. R. Soc. B* **361**: 1023-1038.
- Knoll, A.H., Walter, M.R., Narbonne, G.M. & Christie-Blick, N. (2004): Geology. A new period for the geologic time scale. *Science* **305**: 621-622.

- Koizumi, O. (2007): Nerve ring of the hypostome in hydra: is it an origin of the central nervous system of bilaterian animals? *Brain Behav. Evol.* **69**: 151-159.
- Koizumi, O., Itazawa, M., Mizumoto, H., Minobe, S., Javois, L.C., Grimmelikhuijzen, C.J., Bode, H.R. (1992): Nerve ring of the hypostome in hydra. I. Its structure, development, and maintenance. *J. Comp. Neurol.* **326**: 7-21.
- Koizumi, O., Mizumoto, H., Sugiyama, T., Bode, H.R. (1990): Nerve net formation in the primitive nervous system of Hydra—an overview. *Neurosci. Res. Suppl.* **13**: S165-170.
- Kutschera, U. & Niklas, K.J. (2004): The modern theory of biological evolution: an expanded synthesis. *Naturwissenschaften* **91**: 255-276.
- Kutschera, U. (2001): *Evolutionsbiologie. Eine allgemeine Einführung*. Parey, Berlin.
- Lake, J.A. (1990): Origin of the Metazoa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 763-766.
- Lankester, E.R. (1877): Notes on the embryology and classification of the animal kingdom: Comprising a revision of speculations relative to the origin and significance of the germ-layers. *Q. J. Micr. Sci.*, **17**: 399-441.
- Larroux, C., Fahey, B., Liubicich, D., Hinman, V.F., Gauthier, M., Gongora, M., Green, K., et al. (2006): Developmental expression of transcription factor genes in a demosponge: insights into the origin of metazoan multicellularity. *Evol. Dev.* **8**: 150-173.
- Larroux, C., Luke, G.N., Koopman, P., Rokhsar, D.S., Shimeld, S.M., Degnan, B.M. (2008): Genesis and expansion of metazoan transcription factor gene classes. *Mol. Biol. Evol.* **25**: 980-996.
- Lesh-Laurie, G.E. & Suchy, P.E. (1991): Cnidaria: Scyphozoa and Cubozoa. In: *Microscopic Anatomy of Invertebrates*, Harrison, F.W. & Westfall, J.A. (eds.), Vol. 2: Placozoa, Porifera, Cnidaria, and Ctenophora. Wiley-Liss, New York: 185-266.
- Leys, S. P. & Degnan, B.M. (2002): Embryogenesis and metamorphosis in a haplosclerid demosponge: Gastrulation and transdifferentiation of larval ciliated cells to choanocytes. *Invertebr. Biol.* **121**: 171-189.
- Leys, S.P. & Eerkes-Medrano, D. (2005): Gastrulation in Calcareous Sponges: In Search of Haeckel's Gastraea. *Integrative and Comparative Biology* **45**: 342-351.
- Leys, S.P. (2004): Gastrulation in sponges. In Stern, C. (ed.), *Gastrulation: From cells to embryo*. Cold Spring Harbor Press, pp. 23–31.
- Mackie, G.O. (2004): Central neural circuitry in the jellyfish *Aglantha*: a model 'simple nervous system'. *Neurosignals* **13**: 5-19.
- Mallatt, J.M., Garey, J.R. & Shultz, J.W. (2004): Ecdysozoan phylogeny and Bayesian inference: first use of nearly complete 28S and 18S rRNA gene sequences to classify the arthropods and their kin. *Mol. Phylogenet. Evol.* **31**: 178-191.
- Margulis, L. (1981): *Symbiosis in Cell Evolution*. W.H. Freeman and Company, San Francisco.

- Marlow, H.Q., Srivastava, M., Matus, D.Q., Rokhsar, D., Martindale, M.Q. (2009): Anatomy and development of the nervous system of *Nematostella vectensis*, an anthozoan cnidarian. *Dev. Neurobiol.* **69**: 235-254.
- Marshall, C.R. (2006): Explaining the Cambrian „explosion“ of animals. *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* **34**: 355-384.
- Martin, W. & Russell, M.J. (2003): On the origins of cells: a hypothesis for the evolutionary transitions from abiotic geochemistry to chemoautotrophic prokaryotes, and from prokaryotes to nucleated cells. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* **358**: 59-85.
- Martindale, M. Q., & Henry, J. Q. (1999): Intracellular fate mapping in a basal metazoan, the ctenophore *Mnemiopsis leidyi*, reveals the origins of mesoderm and the existence of indeterminate cell lineages. *Dev. Biol.* **214**: 243-257.
- Matoničkin, I., Klobučar, G. & Kučinić, M. (2009): *Opća zoologija* (u tisku).
- Maynard Smith, J. & Szathmáry, E. (1995): The Major Transitions in Evolution. Freeman, Oxford, UK.
- Mayr, E. & Provine, W. (1980): The evolutionary synthesis: perspectives on the unification of biology. Harvard University Press, Cambridge, Mass.
- Metschnikoff, E. (1874): Zur Entwicklungsgeschichte der Kalkschwamme. *Zeitschr. f. Wiss. Zool.* **24**: 1-14.
- Min, G.-S., Kim, S.-H. & Kim, W. (1998): Molecular phylogeny of arthropods and their relatives: polyphyletic origin of arthropodization. *Mol. Cells* **8**: 75-83.
- Müller, W.E.G. & Müller, I.M. (1999): Origin of the Metazoa: a review of molecular biological studies with sponges. *Mem. Queensl. Mus.* **44**: 381-397.
- Nardi, F., Spinsanti, G., Boore, J.L., Carapelli, A., Dallai, R. & Frati, F. (2003): Hexapod origins: monophyletic or paraphyletic? *Science* **299**: 1887-1889.
- Nielsen, C. (1987): Structure and function of metazoan ciliary bands and their phylogenetic significance. *Acta Zool.* **68**: 205-262.
- Nielsen, C. (2001): Animal Evolution. Interrelationships of the Living Phyla, 2nd Edn. Oxford University Press, Oxford.
- Nieuwkoop, P.D. & Sutasurya, L.A. (1979): Primordial Germ Cells in the Chordates: Embryogenesis and Phylogenesis. Cambridge University Press, Cambridge.
- Nieuwkoop, P.D. & Sutasurya, L.A. (1981): Primordial Germ Cells in the Invertebrates: From Epigenesis to Preformation. Cambridge University Press, Cambridge.
- Niklas, K.J. (1997): The Evolutionary biology of plants. University of Chicago Press, Chicago.
- Paps, J., Baguñà, J. & Riutort, M. (2009): Bilaterian Phylogeny: A Broad Sampling of 13 Nuclear Genes Provides a New Lophotrochozoa Phylogeny and Supports a Paraphyletic Basal Acoelomorpha. *Mol. Biol. Evol.* **26**: 2397-2406.

Pfeiffer, T., Schuster, S. & Bonhoeffer, S. (2001): Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways. *Science* **292**: 504-507.

Philippe, H., Derelle, R., Lopez, P., Pick, K., Borchellini, C., Boury-Esnault, N., Vacelet, J., Renard, E., Houliston, E., Quéinnec, E., Da Silva, C., Wincker, P., Le Guyader, H., Leys, S., Jackson, D.J., Schreiber, F., Erpenbeck, D., Morgenstern, B., Wörheide, G. & Manuel, M. (2009): Phylogenomics Revives Traditional Views on Deep Animal Relationships. *Curr. Biol.* **19**: 706-712.

Price, A.L., & Patel, N.H. (2004): The evolution of gastrulation: Cellular and molecular aspects. In Stern, C. (ed.), *Gastrulation. From cells to embryos*. pp. 695–701. Cold Spring Harbor Press.

Rathke, M.H. (1861): *Entwicklungsgeschichte der Wirbeltiere*. Verlag von Wilhelm Engelmann, Leipzig.

Regier, J.C. & Shultz, J.W. (2001): Elongation factor-2: a useful gene for arthropod phylogenetics. *Mol. Phylogenet. Evol.* **20**: 136-148.

Regier, J.C., Wilson, H.M. & Shultz, J.W. (2005): Phylogenetic analysis of Myriapoda using three nuclear protein-coding genes. *Mol. Phylogenet. Evol.* **34**: 147-158.

Reisinger, E. (1924): Zur Anatomie von *Hypotrichina* (= *Genostoma*) *tergestina* Cal. nebst einem Beitrag zur Systematik der Alloecocoelen. *Zoologischer Anzeiger* **60**: 137-149.

Reisinger, E. (1972): Die Evolution des Orthogons der Spiralier und das Archicölomatenproblem. *Z. Zool. Syst. Evolutionsforsch.* **10**: 1-43.

Riechmann, V., Rehorn, K.P., Reuter, R., Leptin, M. (1998): The genetic control of the distinction between fat body and gonadal mesoderm in *Drosophila*. *Development* **125**: 713-723.

Rieger, R.M. & Ladurner, P. (2003): The Significance of Muscle Cells for the Origin of Mesoderm in Bilateria. *Integrative and Comparative Biology* **43**: 47-54.

Ruiz-Trillo, I., Paps, J., Loukota, M., Ribera, C., Jondelius, U., Baguna, J. & Riutort, M. (2002): A phylogenetic analysis of myosin heavy chain type II sequences corroborates that Acoela and Nemertodermatida are basal bilaterians. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **99**: 11246-11251.

Ruiz-Trillo, I., Riutort, M., Fourcade, H.M., Baguna, J. & Boore, J.L. (2004): Mitochondrial genome data support the basal position of Acoelomorpha and the polyphyly of the Platyhelminthes. *Mol. Phylogenet. Evol.* **33**: 321-332.

Ruiz-Trillo, I., Riutort, M., Littlewood, D.T., Herniou, E.A. & Baguna, J. (1999): Acoel flatworms: earliest extant bilaterian Metazoans, not members of Platyhelminthes. *Science*. **283**: 1919-1923.

Ruppert, E.E. & Carle, K.J. (1983): Morphology of metazoan circulatory systems. *Zoomorphology* **103**: 193-208.

Ruthmann, A., Behrendt, G. & Wahl, R. (1986): The ventral epithelium of *Trichoplax adhaerens* (Placozoa): cytoskeletal structures, cell contacts and endocytosis. *Zoomorphology* **106**: 115-122.

Schmidt-Rhaesa, A. (2007): *The evolution of organ systems*. Oxford University Press, Oxford.

- Schopf, J.W. (1993): Microfossils of the Early Archean Apex chert: new evidence of the antiquity of life. *Science* **260**: 640-646.
- Schopf, J.W. (1999): Cradle of life: the discovery of Earth's earliest fossils. Princeton University Press, Princeton, N.J.
- Sempere, L.F., Martinez, P., Cole, C., Baguna, J. & Peterson, K.J. (2007): Phylogenetic distribution of microRNAs supports the basal position of acoel flatworms and the polyphyly of Platyhelminthes. *Evol. Dev.* **9**: 409-415.
- Sheetz, M.P. & Spudich, J.A. (1983): Movement of myosin-coated fluorescent beads on actin cables *in vitro*. *Nature* **303**: 31-35.
- Shultz, J.W. & Regier, J.C. (2000): Phylogenetic analysis of arthropods using two nuclear protein-encoding genes supports a crustacean + hexapod clade. *Proc. R. Soc. Lond. B* **267**: 1011-1019.
- Simpson, G.G. (1949): The meaning of evolution: a study of the history of life and of its significance for man. Yale University Press, New Haven, Conn.
- Snodgrass, R.E. (1938): Evolution of the Annelida, Onychophora and Arthropoda. *Smithson. Misc. Collect.* **97**: 1-159.
- Sogin, M.L. & Silberman, J.D. (1998): Evolution of the protists and protistan parasites from the perspective of molecular systematics. *Int. J. Parasitol.* **28**: 11-20.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J. (1995): *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*, 3rd Edn. W.H. Freeman and co., New York.
- Stainier, D.Y.R. (2005): No organs left behind: Tales of gut development and evolution. *Science* **307**: 1902-1904.
- Tanaka, M., Wechsler, S.B., Lee, I.W., Yamasaki, N., Lawitts, J.A. & Izumo, S. (1999): Complex modular *cis*-acting elements regulate expression of the cardiac specifying homeobox gene *Csx/Nkx2.5*. *Development* **126**: 1439-1450.
- Telford, M.J. (2009): Animal Evolution: Once upon a Time. *Curr. Biol.* **19**: R339-341.
- Telford, M.J., Bourlat, S.J., Economou, A., Papillon, D., Rota-Stabelli, O. (2008): The evolution of the Ecdysozoa. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B, Biol. Sci.* **363**: 1529-1537.
- Thomas, M.B. & Edwards, N.C. (1991): Cnidaria: Hydrozoa. In: *Microscopic Anatomy of Invertebrates*, Harrison, F.W. & Westfall, J.A. (eds.), Vol. 2: Placozoa, Porifera, Cnidaria, and Ctenophora. Wiley-Liss, New York: 91-183.
- Tyler, S. & Rieger, R.M. (1999): Functional morphology of musculature in the acoelomate worm, *Convoluta pulchra* (Plathelminthes). *Zoomorphology* **119**: 127-141.
- Tyler, S. (2003): Epithelium – the primary building block for metazoan complexity. *Integr. Comp. Biol.* **43**: 55-63.
- Vacelet, J. & Boury-Esnault, N. (1995): Carnivorous sponges. *Nature* **373**: 333-335.

- Vacelet, J. (2006): New carnivorous sponges (Porifera, Poecilosclerida) collected from manned submersibles in the deep Pacific. *Zool. J. Linn. Soc.* **148**: 553-584.
- Valentine, J.W. (2004): On the origin of phyla. University of Chicago Press, Chicago.
- Van den Ent, F., Amos, L.A., & Löwe, J. (2001): Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton. *Nature* **413**: 39-44.
- Wallberg, A., Curini-Galletti, M., Ahmadzadeh, A., Jondelius, U. (2007): Dismissal of Acoelomorpha: acoela and Nemertodermatida are separate early bilaterian clades. *Zool. Scripta.* **36**: 509-523.
- Weyrer, S., Rützler, K. & Rieger, R. (1999): Serotonin in Porifera? Evidence from developing *Tedania ignis*, the caribbean fire sponge (Demospongiae). *Mem. Queensl. Mus.* **44**: 659-665.
- Wheeler, W.C., Cartwright, P. & Hayashi, C.Y. (1993): Arthropod phylogeny: a combined approach. *Cladistics* **9**: 1-39.
- Wigglesworth, V.B. & Lee, V.M. (1982): The supply of oxygen to the flight muscles of insects: a theory of tracheal physiology. *Tissue & Cell* **14**: 501-518.
- Wolpert, L. (1992): Gastrulation and the evolution of development. *In Development Supplement*: 7-13.
- Wolpert, L. (1998): Principles of development. London/Oxford: Current Biology/Oxford University Press.
- Wood, R.L. (1985): The use of *Hydra* for studies of cellular ultrastructure and cell junctions. *Arch. Sci. Genève* **38**: 371-383.
- Xiao, S.H. & Knoll, A.H. (1999): Fossil preservation in the Neoproterozoic Doushantuo phosphorite Lagerstätte, South China. *Lethaia* **32**: 219-240.
- Xiao, S.H., Yun, Y., Knoll, A.H. & Bartley, J.K. (1998): Three-dimensional preservation of algae and animal embryos in a Neoproterozoic phosphorite. *Nature* **391**: 553-558.